F 1330

L: 040403

studii și cercetări de biochimie

1

TOMUL 26

1983

IANUARIE — IUNIE

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

St. cerc. biochim., tomul 26, nr. 1, p. 1 — 84, 1983, București

SCBIAS 26 (1), 1983

COMITETUL DE REDACȚIE

Redactor responsabil:

academician E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUȘANSCHI

Membri:

EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; M. MEZINCESCU; I VASILESCU; VICTORIA ALEXANDRESCU

Secretar de redacție:

CECILIA MOTAȘ

Revista apare de două ori pe an.

În țară, abonamentele se fac la oficiile poștale.

Cititorii din străinătate se pot abona adresîndu-se la ILEXIM, Departamentul Export-Import Presă, P.O. Box 136–137, telex 11226, 79517 – București, str. 13 Decembrie nr. 3.

Manualele, cărțile și revistele pentru schimb, precum și orice corespondență se vor trimite pe adresa Comitetului de redacție al revistei „Studii și cercetări de biochimie" București, P.O. Box 2–2, 78200 – București 2, România.

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

București, Calea Victoriei nr. 125, sectorul 1, cod 79717

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

B I O C H I M I E

TOMUL 26, Nr. 1 1983

IANUARIE — IUNIE

SUMAR

EUGEN MACOVSCHI, Concepţia biostructurală 3

ZOE ANCA, SILVIA GABOR, V. V. PAPILIAN, Acţiunea plumbului şi a cadmiului asupra metabolismului glucidic la şobolan 9

DANIELA ANDREI, LOUIS KAMEL TADROS, CECILIA MOTAŞ, Rolul părţii glucidice în degradarea intracelulară a glicoproteinelor. XVIII. Degradarea deoxiribonucleazei 15

CLAUDIA EVELINA BUDU, C. D. SIMON, Determinarea spectrofotometrică a concentraţiei în acizi rezinici din răşina de pin 23

LUCIA BUZILĂ, Izolarea şi caracterizarea unui factor antiviral obţinut prin extracţia fenolică a colostrului uman 27

ELENA GANEA, ELISABETA MIHĂILESCU, RODICA BÎRNESCU, PAULA PRUNESCU, C. PRUNESCU, Factorul de creştere a nervului. Proprietăţi biologice şi enzimatice 31

OFELIA GOZIA, HORST D. SCHELL, VIORICA LAZĂR, OLGA MOLDOVAN, Caracterizarea catalitică a unei lipaze fungice în stare liberă şi imobilizată pe alcool polivinilic reticulat 40

DUMITRU I. IGA, IRINA TEODORESCU, ILINCA NICOLAE, Distribuţia activităţii arilsulfatazice în organele coropişniţei *(Gryllotalpa gryllotalpa)* 46

CORINA MIHAIL, Interacţiunea lizozimului uman cu unele componente din lapte . 50

G. NEAMŢU, C. PANFIL, C. BOTEZ, GH. ILLYES, K. L. SIMPSON, Conţinutul pigmenţilor carotenoidici din cîteva provenienţe hibride de porumb şi din liniile dihaploide derivate de la acestea 58

ANCA ROŞEANU, MAGDALENA LUNGU, S. S. VASU, β-Galactozidaza din *Lactobacillus bulgaricus*. Izolare şi purificare parţială 64

HORST D. SCHELL, GABRIELA ANGEL, VIOLETA GOVOREANU, Studiul comparativ al preparatelor de catalază imobilizată pe membrane de colagen prin legare covalentă sau prin includere 68

RECENZII 75

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

BIOCHIMIE

TOME 26, N°. 1 1983

JANUARY – JUNE

CONTENTS

EUGEN MACOVSCHI, The biostructural conception 3

ZOE ANCA, SILVIA GABOR, V. V. PAPILIAN, Effect of lead and cadmium on the carbohydrate metabolism in rats 9

DANIELA ANDREI, LOUIS KAMEL TADROS, CECILIA MOTAŞ, The role of carbohydrate moiety in the intracellular degradation of glycoproteins. XVIII. The degradation of deoxyribonuclease 15

CLAUDIA EVELINA BUDU, C. D. SIMON, Spectrophotometric determination of resin acids from native pine resin 23

LUCIA BUZILĂ, Isolation of an antiviral factor by phenol extraction and its characterization 27

ELENA GANEA, ELISABETA MIHĂILESCU, RODICA BÎRNESCU, PAULA PRUNESCU, C. PRUNESCU, Nerve growth factor. Biological and enzymic properties 31

OFELIA GOZIA, HORST D. SCHELL, VIORICA LAZĂR, OLGA MOLDOVAN, Katalytische Eigenschaften einer Lipase aus Pilzen in freiem und in an Polyvinylalkohol immobilisiertem zustand 40

DUMITRU I. IGA, IRINA TEODORESCU, ILINCA NICOLAE, Distribution of arylsulphatasic activity in some organs from mole cricket *(Gryllotalpa gryllotalpa)* 46

CORINA MIHAIL, Human lysozyme interaction with some milk components 50

G. NEAMŢU, C. PANFIL, C. BOTEZ, GH. ILLYES, K. L. SIMPSON, Carotenoid pigment content of several hybrid-maize sources and of the dihaploid lines derived 58

ANCA ROŞEANU, MAGDALENA LUNGU, S. S. VASU, β-galactosidase from *Lactobacillus bulgaricus*. Isolation and partial purification 64

HORST D. SCHELL, GABRIELA ANGEL, VIOLETA GOVOREANU, Vergleichende Untersuchung der durch kovalente Bindung oder Einschluss in Kollagenmembrane erhaltenen immobilisierten Katalase-Präparate 68

REVIEWS 75

CONCEPȚIA BIOSTRUCTURALĂ

EUGEN MACOVSCHI

Rezumat. Tradiționala concepție moleculară reflectă specificul chimic, dar nu și cel biologic al materiei vii. De aceea am elaborat o concepție nouă (1958), pe care am numit-o concepția biostructurală (1968). În sprijinul ei am adus numeroase dovezi indirecte, inclusiv o experiență crucială (1969). Recent, concepția mea a fost confirmată direct de K. R. Porter din S.U.A. (1976—1981) prin microscopie electronică de înaltă tensiune. Astfel, datorită cercetărilor noastre, indirecte și directe, a fost descoperit în celulele vii un nou nivel structural : rețeaua tridimensională biostructural-microtrabeculară.

GENEZA CONCEPȚIEI NOI

Concepția biostructurală este o concepție nouă despre natura și structura materiei vii. Fiind încă student al Universității clujene (1924—1928), am observat o nepotrivire între biologie și chimie. Biologia susține că însușirile biologice depind și sînt condiționate de metabolism, adică de reacțiile chimice care se desfășoară în organismele vii. Or, chimia ne învață că însușirile depind și sînt condiționate de materie, nu de reacții chimice. Pentru a mă lămuri, am cercetat literatura de specialitate. Am constatat cu surprindere că actuala concepție moleculară a materiei vii, după care metabolismul este purtător al însușirilor biologice, este acceptată de biologi ca o axiomă, ca ceva de la sine înțeles. Ea nu a fost supusă vreunei verificări experimentale. Atunci m-am hotărît să aduc dovezi în sprijinul acestei concepții. Timp de 25 de ani (1930—1955) am efectuat cercetări în domeniile excitabilității sistemului neuromuscular, substanțelor curarizante, permeabilității membranelor vii, coacervatelor, biochimiei vegetale, biochimiei animale. În anul 1955 am ajuns la convingerea că valabilitatea concepției moleculare menționate nu poate fi demonstrată datorită deficiențelor ei. Se impunea deci elaborarea unei alte concepții, noi, despre natura și structura materiei vii.

În creația științifică nu există o metodologie standardizată. Neavînd un exemplu concret de urmat, nu-mi rămînea decît să caut un drum propriu. M-am hotărît să apelez la gîndirea deductiv-inductivă. Eram însă conștient că ea mă poate duce la speculații abstracte și inutile, dacă nu va fi ghidată de principii și legi adecvate. Am sesizat că astfel de principii și legi pot fi oferite de filozofie. Însă curente filozofice sînt multe, unele contradictorii. De aceea trebuia chibzuit bine, deoarece de alegerea corectă depindea eventualul succes final. Am ales materialismul dialectic, fiindcă permite descoperirea naturii obiectelor luate în cercetare. În adevăr, în lumina acestei filozofii, natura unui obiect se consideră cunoscută dacă se dezvăluie : factorul care imprimă obiectului însușirile specifice ; specificul obiectului prin care el se deosebește de alte obiecte similare ;

conținutul intern al obiectului. Pentru a trece de la aceste considerente filozofice generale abstracte la aspecte științifice particulare concrete privind natura materiei vii, am elaborat și am aplicat un procedeu nou, pe care l-am numit procedeul comparării-adaptării. El constă în compararea obiectului cercetat, de natură încă necunoscută (materia vie), cu un alt obiect similar, dar cu natură cunoscută (materia nevie). Obiectele similare prezintă asemănări privind aspectele reciproc corespunzătoare ale naturii lor. Astfel, prin adaptarea aspectelor cunoscute ale naturii materiei nevii la specificul materiei vii puteam ajunge la conturarea aspectelor corespunzătoare ale naturii acesteia din urmă. Datorită acestui procedeu am reușit să elaborez o concepție nouă despre natura și structura materiei vii (1955—1958) (1) — (7), pe care mai tîrziu am numit-o teorie biostructurală (1968) (8).

SPECIFICUL CONCEPȚIEI NOI

Deosebirile dintre concepția moleculară și cea biostructurală sînt atît de multe și profunde, încît nu pot fi prezentate în cadrul unui articol scurt. De aceea, pentru ilustrarea lor, mă voi mărgini numai la trei exemple.

1. Conform concepției moleculare tradiționale, materia vie constă dintr-o singură formă a materiei, și anume din combinații chimice aflate într-o singură stare: starea moleculară obișnuită. Potrivit concepției biostructurale, materia vie constă nu dintr-o singură formă a materiei, ci din două forme distincte: din materie biostructurată sau biostructură și din materie moleculară coexistentă. Ambele sînt alcătuite din combinații chimice, dar aflate în stări diferite.

2. Conform concepției moleculare, viața, manifestare a însușirilor biologice, se datorește metabolismului, adică reacțiilor chimice coordonate care se desfășoară în organismele vii. Deci, metabolismul este cauza, iar viața este efectul ei. Potrivit concepției biostructurale, viața se datorește nu metabolismului, ci materiei biostructurate. Aceasta înseamnă că însușirile biologice depind și sînt condiționate de materie (cum susține chimia), și nu de reacții chimice. Datorită mecanismelor cibernetice cuprinse în biostructură, aceasta contribuie la coordonarea reacțiilor chimice din materia moleculară coexistentă. Deci, viața este cauza, iar metabolismul este efectul ei.

3. Conform concepției moleculare, moartea depinde de încetarea metabolismului, adică de încetarea coordonării chimismului din organism. Potrivit concepției biostructurale, moartea depinde de încetarea existenței biostructurii, adică de destrămarea acesteia.

Cele două forme ale materiei cuprinse în materia vie (biostructurată și moleculară) se întrepătrund și sînt în raporturi de coexistență funcțională. Încă din 1958 susțin că materia biostructurată are o conformație spongioasă și se prezintă ca un burete în ale cărui spații interstițiale, infracapilare, se află, sub forma de soluție, materia moleculară coexistentă. Biochimismul ce se desfășoară în materia moleculară furnizează energia necesară formării și funcționării normale a materiei biostructurate, care, prin schimburi cu materia moleculară coexistentă,

contribuie la menținerea compoziției chimice specifice a acesteia și la coordonarea biochimismului ei. De menționat că materia biostructurată nu este o structură chimică moleculară sau supramoleculară statică, ci o structură biologică dinamică, aflată în continuă dezvoltare, și reprezintă un stadiu superior al dezvoltării și organizării materiei comparativ cu materia moleculară nevie.

Odată cu apariția concepției biostructurale s-au pus atît problema verificării valabilității ei, cît și problema raporturilor ei cu concepția moleculară tradițională.

CONFIRMĂRI INDIRECTE

În ceea ce privește prima problemă, nu dispuneam de aparatura adecvată pentru demonstrarea directă, prin fotografiere, a prezenței biostructurii în celulele vii. Puterea de rezoluție a microscoapelor electronice convenționale este prea slabă. De aceea, aceste microscoape arată că materia vie, substanța fundamentală citoplasmică, nu este structurată. Astfel am fost silit să caut dovezi indirecte. Am elaborat anumite procedee de investigație a biostructurii folosind, de exemplu, prese hidraulice, aparatura de rezonanță magnetică nucleară etc. (9). Am efectuat și o experiență crucială (1969) (3, p. 57—58) (10), după modelul dat de J. Perrin (1913) (11). Prin această experiență am demonstrat tot indirect, dar fără tăgadă, existența biostructurii în celulele vii. Am verificat valabilitatea concepției biostructurale prin cinci criterii de evaluare a valabilității teoriilor noi, și anume prin criteriile previziunii, reevaluării, proliferării, extinderii și reciprocității, încadrate în trei căi : experimentală, teoretică și filozofică (6, p. 27). Recent, formalizarea cibernetică a concepției biostructurale, precum și concordanța elementelor și a proceselor ei cu constituentele și structura generală a mecanismului de funcționare a sistemelor cibernetice (criteriul al șaselea — sistemic) (1981) (12) au venit și ele în sprijinul concepției mele. Prin cercetări efectuate cu o mică presă hidraulică de laborator, avînd înălțimea de 40 cm, diametrul de 20 cm și greutatea de 15 kg, am descoperit o serie de însușiri și comportări specifice ale materiei biostructurate, ca variabilitatea dimensiunilor spațiilor interstițiale (6, p. 25), includerea enzimelor (3, p. 171, 172) (13), legături cu formațiunile corpusculare intracelulare (3, p. 186, 187) (14), destrămarea parțială reversibilă (3, p. 152, 232, 249), (7, p. 17) (15), (16), informația (3, p. 75), modificări în cursul cancerizării (17), dimensionalitatea (3, p. 77) etc. Tot pe baza concepției biostructurale am elaborat ipoteze și teorii noi privind permeabilitatea celulară (3, p. 81) (4, p. 111) (18), mecanismul memoriei umane (3, p. 153) (19), relații dintre noxe și medicamente (3, p. 176) (20), relații dintre medicamente și enzime (3, p. 171) (13), comportarea biostructurii la temperaturi diferite (3, p. 202, 244) (21), originea undelor electroencefalografice (22), originea vieții pe Pămînt (23), starea apei în țesuturile vii (3, p. 188) (24), acțiunea hormonilor (3, p. 183) (25), relații între alo- și homeopatie (26), mecanisme de reglare în materia vie (3, p. 65) (27), aspecte cibernetice privind biostructura (28), acțiunea inhibitorilor metabolici (3, p. 223) (29), structuralitatea materiei vii în Univers (30). Am mai schițat primele aspecte ale rolului

materiei biostructurate în alergologie (31), psihiatrie (32), ecologie (33) și genetică (34), precum și în procesele gîndirii abstracte (35) și ale generării cîmpurilor biologice (36).

În domeniul concepției biostructurale au apărut pînă acum 6 cărți, 7 teze de doctorat, peste 125 de lucrări publicate în revistele de specialitate din țară și de peste hotare și numeroase articole în presa românească și străină. Studioul cinematografic „Al Sahia" din București a realizat două filme documentare de scurt metraj privind concepția biostructurală: „Marele secret" (1978) și „Înaintea timpului" (1982).

Cu toate acestea, nu toți biologii se lăsau convinși. Unii refuzau să creadă că, în afara structurilor celulare dezvăluite pînă acum de microscopia fotonică și electronică convențională, ar mai exista în celulele vii un nivel structural, încă nedescoperit, mult mai fin decît nivelele cunoscute. Ei considerau temerare ideile mele privind structuralitatea materiei vii și aspectul spongios, microreticular, al materiei biostructurate, enunțate încă din 1958, fiindcă aceste idei erau în contradicție atît cu concepția moleculară acceptată de ei, cît și cu rezultatele cercetărilor de microscopie electronică convențională. În zadar susțineam că numeroasele dovezi indirecte aduse de mine în sprijinul concepției biostructurale sînt suficiente pentru justificarea valabilității ei. În zadar afirmam că pentru vizualizarea și fotografierea biostructurii este necesar un microscop electronic cu o putere de rezoluție superioară microscoapelor actuale. În zadar exprimam convingerea că în curînd va fi construit un astfel de microscop.

CONFIRMAREA DIRECTĂ

Confirmarea directă a existenței biostructurii a venit mult mai devreme decît mă așteptam. În cursul anilor 1976—1981, profesorul Keith R. Porter de la Universitatea Boulder din Colorado (S.U.A.), împreună cu colaboratorii lui, a confirmat direct concepția biostructurală (37), (38). Lucrînd cu un microscop electronic de înaltă tensiune, avînd lungimea tubului de 10 m, diferența de potențial de un milion de volți, greutatea 22 tone, a cercetat substanța fundamentală citoplasmică (materia vie) și a constatat că ea este structurată și că structura este spongioasă, așa cum susțineam eu încă din anul 1958, adică cu mai bine de două decenii înainte. Astfel a fost adusă confirmarea morfologică a concepției biostructurale. Mai mult, prin investigații speciale făcute cu acest microscop, cercetătorii americani au confirmat întru totul însușirile și comportările materiei biostructurate, descoperite anterior de mine cu ajutorul unei prese hidraulice de laborator. Aceasta este confirmarea funcțională a concepției biostructurale. Astfel, existența biostructurii a fost demonstrată direct.

RAPORTURILE CU CONCEPȚIA MOLECULARĂ

În ceea ce privește problema raporturilor dintre concepția veche, moleculară, și concepția nouă, biostructurală, aceasta a fost rezolvată simplu. Concepția biostructurală (dialectică), fiind o formă superioară

de gîndire despre natura materiei vii în raport cu concepția moleculară (reducționistă, mecanicistă), o include pe aceasta din urmă sub un aspect depășit și subordonat. În adevăr, adepții concepției moleculare au impresia că cercetează materia vie în totalitatea ei. În realitate, ei se preocupă numai de o parte a materiei vii, și anume de materia moleculară coexistentă. Or, materia moleculară coexistentă face parte integrantă din concepția biostructurală. Înseamnă că toate cuceririle științelor biologice realizate pe baza concepției moleculare se integrează organic în concepția biostructurală. Doar interpretarea exclusiv moleculară a acestor cuceriri lasă adesea de dorit din cauza neluării în seamă a existenței biostructurii.

Țin să mulțumesc colaboratorilor mei, care prin cercetările lor au adus contribuții importante la dezvoltarea concepției biostructurale: Alexandrescu Victoria, Aniția Nicolae, Balaban Doina, Ceaușescu Simona, Crainicov Luiza, Elefterescu Viorica, Felecan Constantin, Gaivaronski Boris, Gherghi Andrei, Gozia Ofelia, Hagima Ioana, Mihăescu Angela, Mihăilescu Florin, Mușolan Constanța, Niculescu-Mizil Eugeniu, Popov Doina, Rabega Constantin, Rabega Maria, Stănescu Romeo, grupului de cercetători timișoreni: Simon Zeno, Toșici Aftina, Mihalaș Gheorghe, Secu Cornel, Leca Radu, precum și profesorului Slușanschi Horia, care de la început mi-a acordat un ajutor prețios la redactarea și finisarea multor lucrări.

Prezentat la redacție
la 10 septembrie 1982

Academia R. S. România,
Secția de științe biologice

THE BIOSTRUCTURAL CONCEPTION

SUMMARY

The traditional molecular conception does not reflect the biological specific of the living matter. That is why I have elaborated a new conception (1958), called the biostructural theory (1968). By investigations with a small hydraulic press (1963—1973 and the next ones) I have brought many indirect proofs and experimental facts, a crucial experiment included (1969), supporting this conception. Recently (1976—1981), the biostructural conception has been proved in a direct way by Keith R. Porter and his coworkers (Boulder University, Colorado, USA) by means of a high-voltage electron microscope. So, in quite different ways, Macovschi (1958) and K. R. Porter (1976) discovered in living cells a new microreticular spongious structure, i.e. the biostructural-microtrabecular lattice.

BIBLIOGRAFIE

1. E. MACOVSCHI, *Materia vie și geneza ei*, Contemporanul nr. 34, 1958.
2. E. MACOVSCHI, Rev. chim., 4, 11 (1959).
3. E. MACOVSCHI, *Biostructura*, Edit. Academiei, București, 1969.
4. E. MACOVSCHI, *Natura și structura materiei vii*, Edit. Academiei, București, 1972.

5. E. MACOVSCHI, *Priroda i struktura jivoi materii*, Edit. Academiei, București, 1976.
6. E. MACOVSCHI, *Teoria biostructurală și critica molecularismului contemporan*, în *Probleme actuale de biologie*, vol. 3, Edit. didactică și pedagogică, București, 1978, p. 5.
7. E. MACOVSCHI, *Confirmarea teoriei biostructurale prin microscopie electronică de înaltă tensiune*, Edit. științifică și enciclopedică, București, 1981.
8. E. MACOVSCHI, St. cerc. biochim., **11**, 213 (1968).
9. E. MACOVSCHI, St. cerc. biochim., **12**, 209 (1969).
10. E. MACOVSCHI, Rev. roum. Biochim., **18**, 113 (1981).
11. J. PERRIN, *Les atomes*, Alcan, Paris, 1913.
12. E. NICULESCU-MIZIL, Rev. roum. Biochim., **18**, 45 (1981); **19**, 137 (1982).
13. E. MACOVSCHI, Rev. roum. Biochim., **3**, 321 (1966).
14. E. MACOVSCHI, Rev. roum. Biochim., **6**, 3 (1969).
15. E. MACOVSCHI, S. CEAUȘESCU, St. cerc. biochim., **11**, 331 (1968).
16. E. MACOVSCHI, St. cerc. biochim., **12**, 5 (1969).
17. E. MACOVSCHI, Vitalst. Zivilisationskrank., **8** (*2*), 48 (1963).
18. E. MACOVSCHI, St. cerc. biochim., **8**, 371 (1965); Rev. roum. Biochim., **2**, 285 (1965).
19. E. MACOVSCHI, St. cerc. biochim., **9**, 231 (1966); Rev. roum. Biochim., **3**, 243 (1966); Vitalst. Zivilisationskrank., **12**, 145, 190, 231 (1967).
20. E. MACOVSCHI, Rev. roum. Biochim., **5**, 3 (1968); Vitalst. Zivilisationskrank., **13**, 140 (1968).
21. E. MACOVSCHI, A. MIHĂESCU, St. cerc. biochim., **11**, 337 (1968).
22. E. MACOVSCHI, St. cerc. biochim., **13**, 331 (1970); Protectio vitae, **16**, 30 (1971).
23. E. MACOVSCHI, Vitalst. Zivilisationskrank., **12**, 97 (1967); Biochem. exp. Biol., **9** (*4*), 255 (1970—1971); Rev. roum. Biochim., **16**, 107 (1979).
24. E. MACOVSCHI, I. MARINEANU, Rev. roum. Biochim., **4**, 235 (1967); **17**, 39 (1980).
25. E. MACOVSCHI, Rev. roum. Biochim., **5**, 253 (1968).
26. E. MACOVSCHI, Rev. roum. Biochim., **10**, 255 (1973).
27. E. MACOVSCHI, St. cerc. biochim., **8**, 253 (1965).
28. E. MACOVSCHI, St. cerc. biochim., **7**, 5 (1964); Rev. roum. Biochim., **1**, 5 (1964); Rev. roum. Biol. (s. Botan.), **11**, 333 (1966); St. cerc. econ. ciber., **15**, 39 (1981).
29. E. MACOVSCHI, St. cerc. biochim., **12**, 105 (1969).
30. E. MACOVSCHI, Rev. roum. Biochim., **16**, 281 (1979); **19**, 133 (1982).
31. E. MACOVSCHI, Protectio vitae, **17**, 28 (1972).
32. E. MACOVSCHI, Rev. roum. Biochim., **18**, 27 (1981).
33. E. MACOVSCHI, Rev. roum. Biochim., **17**, 253 (1980).
34. E. MACOVSCHI, *Genetica și biostructura*, Magazin nr. 1166, 1980.
35. E. MACOVSCHI, Biochem. exp. Biol., **12** (*2*), 245 (1976); în *Sisteme în științele naturii*, de M. MALIȚA, Edit. Academiei, București, 1979, p. 117.
36. E. MACOVSCHI, Rev. roum. Biochim., **18**, 267 (1981).
37. J. J. WOLOSEWICK, K. R. PORTER, Amer. J. Anat., **147** (*3*), 303 (1976).
38. K. R. PORTER, J. B. TUCKER, Scient. Amer., **244** (*3*), 57 (1981).

ACȚIUNEA PLUMBULUI ȘI A CADMIULUI ASUPRA METABOLISMULUI GLUCIDIC LA ȘOBOLAN

ZOE ANCA, SILVIA GABOR, V. V. PAPILIAN

Rezumat. S-a studiat acțiunea plumbului 200 ppm (acetat) și a cadmiului 20 ppm (clorură), administrate separat și combinat, în apă, zilnic, intragastric, la șobolani femele, asupra glicemiei, piruvicemiei, lactacidemiei, glicogenului din ficat, rinichi și asupra unor indicatori legați de funcția pancreasului și a glandelor suprarenale. Rezultatele obținute în cazul administrării separate a plumbului au evidențiat o creștere semnificativă a glicemiei, piruvicemiei, lactacidemiei și o scădere a glicogenului din ficat. Cadmiul, administrat separat, a dus la o creștere a piruvicemiei și la o scădere a glicogenului din rinichi. Administrarea concomitentă de Pb + Cd nu a dus la o sumare de efecte la nivelul indicatorilor biochimici studiați. Afectarea metabolismului glucozei, evidențiată de noi în acest experiment, s-ar putea să fie urmarea interacțiunii acestor metale cu funcția pancreasului (scădere a numărului de insule Langerhans) și cu funcția glandelor suprarenale (creștere a greutății lor relative, scădere a conținutului de glicogen și acid ascorbic).

Plumbul și cadmiul sînt contaminanți importanți ai mediului înconjurător, cadmiul fiind totdeauna un element însoțitor al plumbului și zincului în mine și topitorii. Astfel, în prelucrarea industrială a diferitelor minereuri, muncitorii sînt expuși simultan acțiunii combinate a acestor două metale, fapt care poate constitui un factor etiologic al diferitelor procese patologice.

Se cunoaște că mecanismul sau acțiunea unui toxic poate fi modificată în prezența unui compus toxic similar, ca urmare a utilizării unor căi metabolice comune. Astfel, plumbul și cadmiul exercită efecte toxice asemănătoare asupra sistemului nervos și hematopoetic (1), prezintă afinități pentru grupările tiol active ale unor enzime (2),(3),(4),(5), (6), determină leziuni asemănătoare în ficat și rinichi (5), (7), (8).

Avînd în vedere aceste date, precum și unele indicații din literatură cu privire la acțiunea toxică a acestor metale asupra metabolismului glucidic (8), (9), (10), în lucrarea prezentă ne-am propus să studiem acțiunea separată și combinată a acestor două metale asupra glicolizei anaerobe la șobolanul alb.

În acest sens, am dozat glucoza din sînge ca element inițial al glicolizei, acizii lactic și piruvic din sînge ca produși finali ai glicolizei și glicogenul din ficat și rinichi ca rezervă glucidică importantă.

Legat de procesele de glicoreglare, am studiat aspectul histopatologic al pancreasului endocrin și funcția glandelor suprarenale prin urmărirea greutății lor relative, aspectul histopatologic și conținutul în acid ascorbic și glicogen.

MATERIAL ŞI METODE

Experienţele s-au efectuat pe şobolani albi, femele, în greutate iniţială de 160—180 g. Animalele au fost împărţite în loturi după cum urmează :

— şobolani care au primit zilnic, intragastric, timp de 30 de zile o doză de 200 ppm plumb (acetat) ;

— şobolani care au primit zilnic, 30 de zile, intragastric, 20 ppm cadmiu (clorură) ;

— şobolani care au primit simultan plumb şi cadmiu, zilnic, intragastric, 30 de zile ;

— şobolani care au primit zilnic, intragastric, apă de robinet.

La sfîrşitul experimentului, animalele au fost sacrificate prin decapitare, după o prealabilă anestezie cu nembutal.

S-au dozat glucoza din sînge (11), acidul lactic şi piruvic (12), glicogenul din ficat, rinichi şi glandele suprarenale (13), acidul ascorbic din suprarenale (14).

De asemenea, s-a efectuat examenul histopatologic al pancreasului după o prealabilă fixare în reactiv Bouin şi colorare cu hematoxilină-eozină şi examenul histopatologic al glandelor suprarenale după fixare în formol şi colorare cu hematoxilină-eozină.

Rezultatele obţinute au fost prelucrate statistic folosindu-se media aritmetică ($\bar{x}$), testul de probabilitate (p) şi diferenţele procentuale (%) faţă de martor.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

După cum reiese din figura 1, glicemia nu este afectată semnificativ la lotul de animale tratat cu cadmiu, deşi există o tendinţă spre

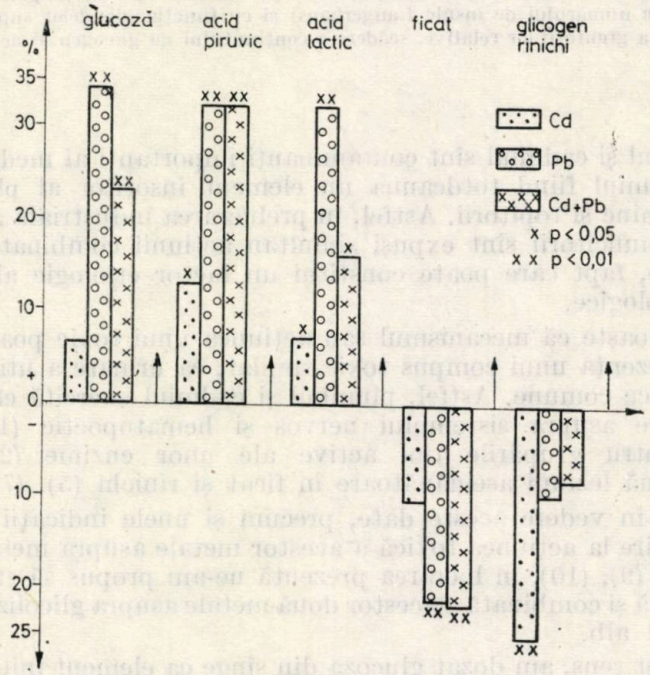


Fig. 1. — Modificări procentuale faţă de martor şi semnificaţia statistică a glicemiei, piruvicemiei, lactacidemiei şi conţinutului în glicogen din ficat şi rinichi la şobolani trataţi cu Pb, Cd şi Pb + Cd.

hiperglicemie. Animalele tratate cu plumb prezintă o creştere semnificativă a glicemiei ($p < 0,01$).

În cazul administrării combinate de Pb + Cd, glicemia rămîne în continuare crescută faţă de lotul de animale martor.

Lactacidemia și piruvicemia, la animalele tratate cu cadmiu, prezintă creșteri cu o semnificație statistică de $p < 0,05$, pe cînd la animalele tratate cu plumb creșterea acestor doi indicatori biochimici prezintă o semnificație de $p < 0,01$ și o diferență procentuală de 32% față de animalele martor.

La lotul de animale tratat cu Pb+Cd se constată de asemenea creșteri semnificative ale acidului lactic și piruvic, valori apropiate de cele ale animalelor tratate numai cu plumb.

Rezultatele noastre privind acțiunea combinată a Pb+Cd asupra glicemiei și lactacidemiei nu evidențiază o potențare de efecte a acestor două metale. S-ar putea ca doza de cadmiu aleasă de noi să nu fie suficient de mare (20 ppm) pentru a prezenta o competiție față de ionii de plumb (200 ppm) la nivelul acestor indicatori biochimici.

Creșterea piruvicemiei și a lactacidemiei evidențiată de noi în cazul animalelor tratate cu plumb ar putea fi consecința accentuării glicolizei anaerobe, precum și a afectării activității complexului enzimatic piruvat-dehidrogenază, enzimă SH prin blocarea activității căreia acidul piruvic nu ar mai fi acetilat și trecut în ciclul Krebs și ar crește concentrația lui în sînge.

Glicogenul din ficat (fig. 1) prezintă scăderi semnificative la toate grupele de animale studiate, cu semnificație statistică numai la animalele tratate cu plumb și Pb+Cd. Scăderea glicogenului hepatic ar putea fi urmarea creșterii glicogenolizei, fapt ce ar explica în parte hiperglicemia.

Glicogenul din rinichi este scăzut semnificativ numai la animalele tratate cu cadmiu, ceea ce dovedește sensibilitatea crescută a acestui organ față de acest metal.

Examenul histopatologic al pancreasului la animalele tratate cu plumb evidențiază o scădere a numărului de insule Langerhans (tabela 1), iar celulele insulare sînt tumefiate, cu capilarele obliterate. Există

Tabela 1

Acțiunea plumbului și a cadmiului asupra pancreasului (număr de insule Langerhans). Evidențiere histologică

Martor	Cadmiu	Plumb	Pb+Cd
$\bar{x} = 17$	$\bar{x} = 14$ (17,7%)	$\bar{x} = 15$ (11,8%)	$\bar{x} = 16$ (5,9%)

Notă. (%) = modificări procentuale față de martor.

celule acinoase cu citoplasma omogen eozinofilă, lipsită de bazofilie subnucleară, date care pledează pentru o insuficiență a proceselor de elaborare a insulinei.

Animalele tratate cu cadmiu și Pb+Cd prezintă de asemenea o diminuare a numărului de insule Langerhans, aspectul histologic fiind

asemănător cu cel descris la animalele tratate cu plumb. Aceste modificări histopatologice ar fi un indicator al unei scăderi a secreţiei pancreasului, fapt ce ar explica în parte hiperglicemia evidenţiată de noi şi de alţi autori prin expunerea la aceste metale (15), (16), (17), (18). Astfel, o participare a pancreasului la tulburările metabolismului glucidic a fost explicată prin nivelul scăzut al insulinei serice şi prin creşterea Cd-tioneinei în pancreas (8), (15), (17). Glandele suprarenale (fig. 2) prezintă creşteri

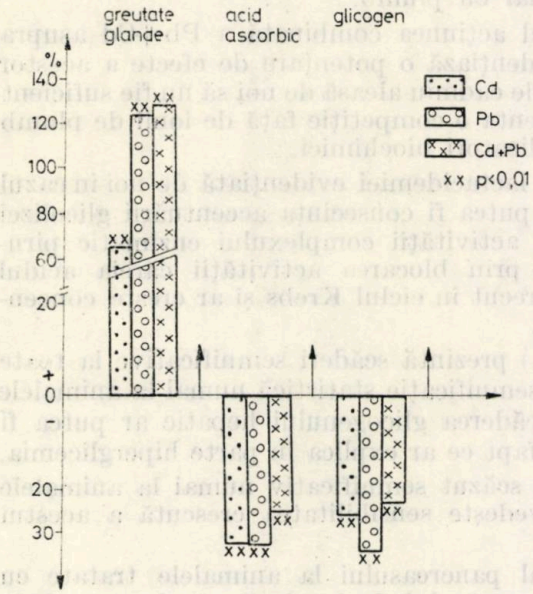


Fig. 2. — Modificări procentuale faţă de martor şi semnificaţia statistică a greutăţii relative şi conţinutului de glicogen şi acid ascorbic din glandele suprarenale la şobolani trataţi cu Pb, Cd şi Pb+Cd

ale greutăţii lor relative la toate grupele de animale, cele mai mari întîlnindu-se la animalele tratate cu plumb şi Pb+Cd.

Examenul histopatologic al glandelor suprarenale evidenţiază o hiperplazie la nivelul stratului fasciculat al corticalei la toate grupele de animale. Pentru a putea aprecia starea de activitate a glandelor suprarenale, am dozat glicogenul şi acidul ascorbic din aceste glande. În acest sens, datele din literatură pledează pentru faptul că, în condiţii de stress (acut sau cronic) la şobolan, acidul ascorbic şi glicogenul din suprarenale joacă un rol energetic major atît în secreţia de ACTH, cît şi în secreţia de hormoni glucocorticoizi (19), (20). Rezultatele obţinute de noi evidenţiază o scădere semnificativă a concentraţiei acidului ascorbic şi a glicogenului la toate grupele de animale (fig. 2).

Datele obţinute sînt în acord cu observaţiile altor autori cu privire la creşterea reactivităţii acestor glande sub acţiunea plumbului şi cadmiului (15), (21), (22). Aceste date sugerează că expunerea la diferite metale duce la o stare de stress şi poate constitui un factor etiologic al unor procese patologice.

Afectarea homeostaziei glucozei, evidenţiată de noi în cazul animalelor tratate cu plumb şi Pb+Cd, ar putea fi rezultatul unor perturbări atît în funcţia secretorie a pancreasului (scădere), cît şi în activitatea glandelor suprarenale (hiperfuncţie).

CONCLUZII

1. Plumbul în concentrație de 200 ppm, administrat la șobolani femele timp de 30 de zile, induce modificări semnificative ale homeostaziei glucozei, evidențiate prin hiperglicemie, hiperlactacidemie, hiperpiruvicemie și scădere a conținutului de glicogen în ficat.

2. Administrarea de cadmiu în concentrație de 20 ppm la șobolani femele timp de 30 de zile nu modifică semnificativ glicemia, iar acidul lactic și piruvic prezintă creșteri cu o semnificație slabă.

3. Administrarea simultană de plumb și cadmiu nu duce la efecte aditive la nivelul parametrilor biochimici studiați.

4. Afectarea homeostaziei glucozei la animalele tratate cu plumb și Pb+Cd se pare să fie urmarea interacțiunii acestor metale cu funcția secretorie a pancreasului (scădere) și cu starea funcțională a glandelor suprarenale (hiperfuncție).

Prezentat la redacție
la 21 mai 1982

Institutul de igienă și sănătate publică
Cluj-Napoca, str. Pasteur nr. 6

EFECT OF LEAD AND CADMIUM ON THE CARBOHYDRATE METABOLISM IN RATS

SUMMARY

Female rats divided into three groups, were given perorally, in water, a daily dose of 200 ppm Pb (as acetate) and 20 ppm Cd (as chloride) and simultaneously 200 ppm Pb+20 ppm Cd for 30 days. Tape water was administered to the control rats.

The determinations of glucose, lactic acid and pyruvic acid in the blood, of glycogen content in the liver and kidney and the histopathological evaluation of the pancreas and adrenal glands were performed.

The adrenal weight as well as the content of glycogen and ascorbic acid were measured for the functional evaluation of adrenal glands.

A significant increase of glucose, pyruvic acid and lactic acid in the blood and a decrease of glycogen and ascorbic acid in adrenal glands following the lead intake was observed.

An increase of pyruvic acid in the blood and a decrease of glycogen in the kidney and adrenal glands were observed in cadmium treated animals.

The simultaneous administration of lead and cadmium did not induce additive toxic effects on the biochemically investigated parameters of the carbohydrate metabolism.

The alteration of glucose metabolism evidenced in our experiment may be due to an interaction of these metals with the pancreas function (a decreased number of Langerhans cells) and with the adrenal glands function (an increased weight and a fall of the content of glycogen and ascorbic acid).

BIBLIOGRAFIE

1. J. H. EXON, L. D. KOLLER, ISAACSON KERKVLIET, Arch. Environm. Hlth., **34**, 469 (1979).
2. J. E. KENCH, P. J. D. GUBLO, Biochem. J., **120**, 27 (1970).
3. T. YOSHIDA, Y. ITO, Y. SUZUKI, Bull. Environm. Contam. Toxicol., **15**, 402 (1976).
4. Z. ANCA, S. GABOR, St. cerc. biochim., **18**, 5 (1975).
5. K. R. MAHAFFEY, J. J. RADER, J. M. SCHOEFER, Bull. Environm. Contam. Toxicol., **25**, 541 (1980).
6. D. F. FLICK, H. KRAYBILL, J. M. DIMITROFF, Environm. Res., **4**, 71 (1978).
7. J.H.J. COPIUS PEEREBOOM-STEGEMAN, J. MELET, J. W. COPIUS PEEREBOOM, Toxicology, **14**, 67 (1979).
8. T. GHAFGHAZI, J. H. MENNEAR, Toxicol. Appl. Pharm., **26**, 231 (1973).
9. A. SPORN, I. DINU, L. STOENESCU, Rev. roum. Biochim., **7**, 299 (1970).
10. Z. ANCA, I. DEACIUC, E. PORA, St. cerc. biol., Seria biol. anim., **30**, 61 (1978).
11. S. D. HUGGET, D. A. NIXON, Lancet, *2682*, 273 (1957).
12. H. U. BERGMEYER, *Methods of Enzymatic Analysis*, Academic Press, New York—London, 1963, 788—792.
13. R. MONTGOMERY, Arch. Biochem. Biophys., **67**, 378 (1957).
14. J. C.ROE, C. A. KUTHER, J. Biol. Chem., **222**, 399 (1947).
15. Z. ANCA, teză de doctorat, Univ. Babeş-Bolyai, Cluj-Napoca, 1979.
16. Z. ANCA, S. GABOR, St. cerc. biochim., **24**, 15 (1981).
17. R. L. SINGAL, Science, **183**, 1904 (1974).
18. D. W. FASSET, Ann. Rev. Pharm., **15**, 71 (1975).
19. I. MADAR, N. ŞILDAN, I. ILONCA, St. cerc. biol. anim., **29**, *1*, 63 (1977).
20. P. K. DIXIT, A. LUZOROV, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **124**, *3*, 719 (1967).
21. Z. ANCA, S. GABOR, V. V. PAPILIAN, Toxicology Letters, Second International Congress on Toxicology, Bruxelles, 1980, p. 137.
22. RAYMOND DER, MAHOMED YOUSEF, ZUHAL FAHIM, MUSTAFA FAHIM, Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology, **17**, *2*, 237 (1977).

ROLUL PĂRȚII GLUCIDICE ÎN DEGRADAREA INTRACELULARĂ A GLICOPROTEINELOR. XVIII. DEGRADAREA DEOXIRIBONUCLEAZEI

DANIELA ANDREI, LOUIS KAMEL TADROS*, CECILIA MOTAȘ

Rezumat. S-a urmărit modul de degradare cu tripsină a deoxiribonucleazei I pancreatice bovine după tratarea cu α-manozidază și N-acetilglucozaminidază. Modificările obținute au fost urmărite în raport cu martorul (DN-ază netratată) prin determinarea activității enzimatice în gel de agaroză prin metoda difuziei radiale. S-a ajuns la concluzia că primele resturi de manoză reprezintă un factor de frînare a activității DN-azei, deoarece prin îndepărtarea acestora se produce o creștere a activității enzimatice, precum și o stabilitate a ei în soluție. S-a constatat totodată că prezența N-acetilglucozaminei conferă moleculei rezistență la proteoliză.

Se discută rolul de moderator al părții glucidice în activitatea DN-azei în mediul intestinal.

Deoxiribonucleaza I pancreatică bovină a fost cristalizată de M. Kunitz (1) din 1950, dar abia în 1967 U. Lindberg (2) a obținut enzima într-o stare mai pură. În 1969, P. A. Price și colab. (3) au purificat-o mai avansat, aducînd-o într-o stare omogenă și stabilă, deoarece cercetătorii care o studiaseră anterior nu au putut să o obțină liberă de alte activități enzimatice din pancreas, mai ales de tripsină (4). Preparatele comerciale de enzimă își pierdeau activitatea în soluție, la pH neutru, datorită tripsinei contaminante, fiind mai stabile la pH 5,0 sau 6,0 (3). Ulterior s-a arătat că ionii de Ca^{++} și Mn^{++} protejează enzima complet de inactivare prin enzime proteolitice (5). Concomitent s-a demonstrat că numai ionul de Ca^{++} protejează enzima contra inactivării cu tripsină, nu și ionul de Mn^{++} (6).

Pe de altă parte, s-a demonstrat că DN-aza este o enzimă de natură glicoproteică (3), (7), conținînd un singur lanț glucidic simplu per moleculă, format din cinci resturi de manoză și două de glucozamină (7).

DN-aza este formată dintr-un lanț polipeptidic, avînd următoarea secvență de aminoacizi în jurul unității glucidice (8): Ser—*Asn*—Ala—Thr.

Prezența în pancreas a tripsinei, precum și a DN-azei în lizozomi (9), formațiunile cu echipamentul proteazic al celulei, ridică problema modului de comportare a enzimei în prezența enzimelor proteolitice și mai ales a implicării posibile a lanțului glucidic în această comportare.

Luînd în considerare structura simplă a lanțului glucidic, am ales ca model experimental tratarea succesivă a DN-azei cu cele două exoglicozidaze specifice, α-manozidaza și N-acetilglucozaminidaza, pentru a putea decela eventuala specificitate de rest glucidic a mecanismului de degradare a enzimei.

MATERIAL ŞI METODE

— Deoxiribonucleaza I ex. bovine pancreas, salt-free, lyoph., Koch-Light Laboratories Ltd.

— ADN-Na salt ex. calf. thymus, Lightly polymerised, Koch-Light Laboratories Ltd.

— Tripsină 2 × cryst. lyophil. salt-free — Serva.

α-Manozidaza şi α-N-acetilglucozaminidaza au fost izolate din cotiledoane de *Phaseolus vulgaris* var. *great-northern*, după metoda indicată de K. Agraval (10), prin cromatografie pe DEAE-Sephadex A_{50}. Determinările de activitate enzimatică pentru fracţiunile separate cromatografic s-au făcut spectrofotometric, după metoda lui Om P. Bahl (10), cu modificări după J. Findally (11).

Probele care au dovedit activitate α-manozidazică au avut şi activitate α-N-acetilglucozaminidazică, astfel că preparatul izolat de noi are dublă activitate (12).

Îndepărtarea părţii glucidice prin acţiunea succesivă a exoglicozidazelor. DN-aza s-a dizolvat într-un amestec de două soluţii tampon, tampon citrat 0,05 M, pH 4,0 (2,8 ml) pentru enzimele glicozidazice (11) şi tampon Tris 0,05 M, pH 8,0 + $CaCl_2$ 0,02 M (0,4 ml), amestecul avînd pH final în jur de 6,0, apropiat de pH-ul optim al DN-azei şi de cel optim al glicozidazelor. De asemenea am adăugat Ca^{2+} pentru stabilizarea DN-azei, împiedicînd astfel proteoliza ei de către chemotripsina B, care o contaminează în preparat.

Pentru îndepărtarea resturilor glucidice s-au întrebuinţat exoglicozidaze specifice: α-manozidază şi N-acetilglucozaminidază, izolate de noi din cotiledoane de *Phaseolus vulgaris*. Aceste două enzime s-au găsit împreună în aceeaşi fracţiune, avînd o concentraţie proteică de 8 500 μg/ml. Probele folosite au fost B, C şi D, care au diferit între ele prin raportul enzimă : substrat, ca şi prin timpul de incubare.

În prima zi, probele B, C şi D au conţinut DN-ază şi enzimă glicozidazică în raport de 6 : 1. După 24 de ore de incubare la 35°C, s-a adăugat din nou enzimă glicozidazică în acelaşi raport peste probele B şi C. O nouă cantitate de enzimă glicozidazică a fost adăugată a treia zi peste proba B.

Drept martori s-au folosit probele A (martor incubat 72 ore) şi E (martor neincubat).

Proteoliza cu tripsină a DN-azei intacte şi tratate cu glicozidaze. Din probele de DN-ază tratate cu enzime glicozidazice s-au luat 0,8 ml (1 mg DN-ază) şi s-au tratat cu tripsină (20 μg în 0,2 ml) în raport de 1 : 50, prin incubare la 35°C, timp de o oră.

Experimentul s-a repetat pentru 5 şi 24 ore de incubare.

Probele conservate prin îngheţare au fost supuse analizei pentru determinarea activităţii enzimatice prin difuzie radială în gel de agaroză.

Pentru o mai uşoară înţelegere, schema de lucru este prezentată sub formă de tabel (tabela 1).

Determinarea semicantitativă a activităţii enzimatice prin difuzie radială în gel s-a aplicat după indicaţiile date de W. B. Schill (13) şi C. Muşolan (14), pe gel de agaroză 1 % conţinînd 0,1 % ADN înalt polimerizat drept substrat. După 16 ore de difuzie, stoparea reacţiei s-a făcut prin fixare în acid acetic-etanol-apă (5 : 20 : 75) şi colorare cu albastru de toluidină 0,3 %, 30 min.

REZULTATE

Caracterizarea, înainte şi după proteoliză, a DN-azei tratate cu exoglicozidaze

Modificarea enzimei prin glicozidaze şi prin tripsinoliză s-a urmărit prin determinarea activităţii şi prin metode care să evidenţieze structura proteică şi glicoproteică.

Activitatea enzimatică, determinată prin metoda difuziei radiale în gel, este prezentată în tabela 2.

Deoarece ne interesa modificarea activităţii, comparativ, a probelor netratate (E şi A), respectiv neincubate şi incubate, cu cele tratate cu glicozidaze, rezultatele le-am raportat la suprafaţa zonelor de hidroliză.

Tabela 1

Condițiile de experiment pentru probele conținînd DN-ază

Proba	Incubare la 35°C						Conservare prin:
	DN-ază	tampon Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0+ $CaCl_2$ 0,02 M	tampon citrat 0,05 M, pH 4,0	enzime glicozidazice (α-manozidază și N-acetil-glucozaminidază)	tampon Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0+ $CaCl_2$ 0,02 M	cu tripsină (raport 1 : 50)	
A	4 mg	0,4 ml	2,8 ml, 72 ore	—	0,24 ml	0,8 ml A+0,2 ml tripsină — 24 ore (20 μg) 0,8 ml A+0,2 ml tripsină — 5 ore (20 μg) 0,8 ml A+0,2 ml tripsină — o oră (20 μg)	înghețare
B	4 mg	0,4 ml	2,8 ml	0,24 ml, 72 ore	—	0,8 ml B+0,2 ml tripsină — 24 ore (20 μg) 0,8 ml B + 0,2 ml tripsină — 5 ore (20 μg) 0,8 ml B+0,2 ml tripsină — o oră (20 μg)	înghețare
C	4 mg	0,4 ml	2,8 ml	0,16 ml, 48 ore	0,08 ml	0,8 ml C+0,2 ml tripsină — 24 ore (20 μg) 0,8 ml C+0,2 ml tripsină — 5 ore (20 μg) 0,8 ml C+0,2 ml tripsină — o oră (20 μg)	înghețare
D	4 mg	0,4 ml	2,8 ml	0,08 ml, 24 ore	0,16 ml	0,8 ml D+0,2 ml tripsină — 24 ore (20 μg) 0,8 ml D+0,2 ml tripsină — 5 ore (20 μg) 0,8 ml D+0,2 ml tripsină — o oră (20 μg)	înghețare
E	4 mg	0,4 ml neincubat	2,8 ml	—	0,24 ml	0,8 ml E+0,2 ml tripsină — 24 ore (20 μg) 0,8 ml E+0,2 ml tripsină — 5 ore (20 μg) 0,8 ml E+0,2 ml tripsină — o oră (20 μg)	înghețare

Evaluarea procentuală a activităţii enzimatice reziduale a probelor tratate cu glicozidaze în raport cu cele două probe netratate, E neincubată şi A incubată, este dată în tabela 3.

Tabela 2

Activitatea enzimatică a probelor de DN-ază, exprimată în suprafaţa inelelor de difuzie radială în gel (mm^2)

Proba	În prezenţă de glicozidaze	În prezenţă de glicozidaze şi tripsină		
		o oră	5 ore	24 ore
E	346	177	64	50
A	154	113	95	64
D	227	154	64	64
C	95	95	95	78
B	64	28	20	28

Simpla incubare de 72 ore a probei de DN-ază (A) scade activitatea enzimatică pînă la 44%, demonstrînd că prezenţa $CaCl_2$, în concentraţie de 2 mM în probă, nu reuşeşte să protejeze enzima de acţiunea urmelor de tripsină din preparat, aşa cum precizează P. A. Price (15). Îndepărtarea manozei (D) conduce la mărirea stabilităţii, rămînînd o activitate de 66%. Îndepărtarea ulterioară a altor resturi de manoză scade activitatea pînă la 27%, iar îndepărtarea N-acetilglucozaminei o diminuează pînă la 18%.

Dacă raportăm modificările prin glicozidaze la proba A, de DN-ază incubată, atunci tratarea de 24 ore cu manozidază creşte activitatea la 147%, arătînd şi astfel rolul de frînare a activităţii prin prima manoză. Îndepărtarea ulterioară a resturilor de manoză şi de N-acetilglucozamină scade activitatea la 62% şi apoi la 42%. Această scădere este evidentă luînd oricare din probele tratate cu glicozidaze ca martor pentru ultima probă, B.

Se mai constată că şi scăderea următoare la 62% la proba C faţă de proba incubată este mai mică decît scăderea obţinută la proba incubată (A), de 44%.

În general, îndepărtarea resturilor glucidice face ca scăderea activităţii prin incubare să fie mai mică decît la proba cu întregul lanţ glucidic intact. Reiese faptul că, după îndepărtarea lanţului glucidic, molecula proteică devine mai rezistentă, activitatea scăzînd mai lent.

Tripsinoliza, în raportul 1 : 50, prezentată în tabela 4, aduce date noi asupra implicării resturilor glucidice în activitatea enzimatică a DN-azei.

Proba E, neincubată, pierde 50% din activitate după o oră de tripsinoliză, scăzînd după 5 ore la un rest de 18%, care se menţine practic neschimbat şi după 24 de ore (15%).

Proba A, incubată, îşi diminuează activitatea prin proteoliză mult mai lent, ajungînd după 24 de ore să aibă încă 42% din activitatea iniţială.

Comportarea probelor tratate cu glicozidaze o vom compara numai cu aceea a probei A, incubată. Se constată la proba D o tripsinoliză mult mai avansată după 5 ore, care se menţine şi după 24 de ore. Proba incubată 48 de ore cu α-manozidază nu-şi mai pierde activitatea la tripsino-

liză; abia după 24 de ore ajunge la 82% din activitate. Proba B, incubată de trei ori cu glicozidaze, își pierde foarte mult din activitate de la prima oră de tripsinoliză, care coboară apoi lent la 5 ore, rămînînd constantă și la 24 de ore.

Tabela 3

Exprimarea procentuală a activității enzimatice reziduale a probelor tratate cu glicozidaze în raport cu probele netratate

Proba	E	A	D	C	B
E	100	44	66	27	18
A	—	100	147	62	42
D	—	—	100	42	28
C	—	—	—	100	67
B	—	—	—	—	—

Tabela 4

Exprimarea procentuală a activității enzimatice reziduale după tripsinoliza probelor de DN-ază tratate cu glicozidaze

Proba	Tripsinoliza		
	o oră	5 ore	24 ore dil.
E	51	18	15
A	73	62	42
D	68	28	28
C	100	100	82
B	44	31	31

Modificările activității enzimatice după tripsinoliză, dependente de resturile glucidice, sînt mai bine exprimate în figura 1.

Enzima proaspăt preparată este cea mai susceptibilă la proteoliză, cu toată prezența $CaCl_2$ în mediul de reacție la o concentrație de 2 mM.

Dacă la o oră probele B și D se comportă oarecum diferit, după 5 ore ele au aceeași comportare.

Proba C, tratată cu glicozidaze, cu α-manozidază rămîne complet rezistentă la tripsinoliză.

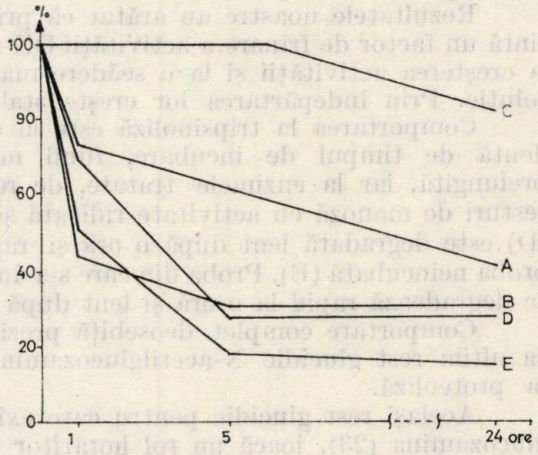


Fig. 1. — Activitatea enzimatică reziduală, exprimată procentual, după tripsinoliza probelor de DN-ază tratate cu glicozidaze.

Variațiile obținute de noi nu sînt dependente de concentrația ionului de Ca^{++} în soluție, aceasta fiind aceeași la toate probele.

DISCUȚII

DN-aza, ca și tripsina, este o enzimă Ca^{++} dependentă (15), (16). Ionul de Ca^{++} este necesar pentru prinderea de acizii nucleici cu formarea de complecși DNA-ion metalic, substratele pentru acțiunea DN-azei (17).

Dar ionul de Ca^{++} protejează enzima şi de inactivarea prin tripsină sau chimotripsină (3), prin prinderea lui reversibilă la locuri de legare specifice pe molecula proteică (5), locuri care sînt în strînsă proximitate cu locul de prindere a substratului şi probabil interdependente (18).

Descifrarea structurii complete a monolanţului polipeptidic de 31 000 greutate moleculară a DN-azei a indicat o structură formată din 257 de aminoacizi, avînd lanţul glucidic prins la asparagina 18, şi gruparea —SS— esenţială între cisteinele 170—206, cu leucina ca aminoacid N-terminal şi treonina ca aminoacid C-terminal (19).

S-a demonstrat că modificarea histidinei 118 (19), (20) sau a tirozinei 62 (18) conduce la inactivarea completă a enzimei.

Proteoliza controlată cu chimotripsină a condus la o singură clivare a lanţului între resturile 178 şi 179, fără inactivare (21), în două molecule cu activitate enzimatică, care îşi măresc activitatea în prezenţa ionului de Ca^{++}.

Păstrînd întotdeauna aceeaşi concentraţie a ionului de Ca^{++}, am încercat să determinăm dacă lanţul glucidic de la capătul N-terminal este implicat în activitatea enzimatică sau în modul de degradare prin tripsină, ştiută fiind importanţa capătului C-terminal pentru conformaţia activă a enzimei (22).

Molecula DN-azei trebuie să fie astfel conformată încît să aibă capătul C-terminal cu centrul activ în interiorul ei, avînd în vedere inaccesibilitatea carboxipeptidazei la acest capăt (21) şi capătul N-terminal la suprafaţă, datorită hidrofiliei lanţului glucidic. Judecînd astfel, partea glucidică nu ar putea fi implicată în centrul activ, dar ar putea contribui la comportarea la proteoliză.

Rezultatele noastre au arătat că primele resturi de manoză reprezintă un factor de frînare a activităţii DN-azei, îndepărtarea lor conducînd la creşterea activităţii şi la o scădere mai lentă în timp a activităţii în soluţie. Prin îndepărtarea lor creşte stabilitatea moleculei de DN-ază.

Comportarea la tripsinoliză este la enzima martor complet dependentă de timpul de incubare, fiind mai rezistentă după o incubare prelungită, iar la enzimele tratate, de restul glucidic. Proba fără 1—2 resturi de manoză cu activitate ridicată şi aparentă stabilitate în soluţie (D) este degradată lent după o oră şi rapid după 5 ore, asemănător cu proba neincubată (E). Proba din care s-a îndepărtat şi N-acetilglucozamina se degradează rapid la o oră şi lent după 5 ore.

Comportare complet deosebită prezintă proba C, care are probabil ca ultim rest glucidic N-acetilglucozamină, devenind complet rezistentă la proteoliză.

Acelaşi rest glucidic pentru care există receptori celulari, N-acetilglucozamina (23), joacă un rol hotărîtor în comportarea la proteoliză a DN-azei.

Partea glucidică are implicaţii în activitatea DN-azei, mai ales în modul de comportare la tripsinoliză, mecanism extrem de important în cazul coexistenţei lor în mediul intestinal.

Deci, pe lîngă efectul stabilizator al Ca^{++}, care se găseşte în sucul pancreatic bovin în concentraţie de 0,4—3 mM (24), adecvat să ţină DN-aza funcţională, partea glucidică joacă şi ea un rol moderator în activitatea DN-azei.

CONCLUZII

Primele resturi de manoză reprezintă un factor de frînare a activității DN-azei, prin îndepărtarea lor crescînd activitatea și stabilitatea enzimei în soluție.

Rezultatele noastre au mai arătat că resturile glucidice sînt implicate puternic și în comportarea la proteoliză a DN-azei, restul de N-acetil-glucozamină terminal făcînd molecula complet rezistentă la proteoliză.

Prezentat la redacție
la 6 decembrie 1982

Laboratorul de imunochimie,
Institutul de științe biologice București
și
* *Faculty of Agriculture,*
El Mansoura Univ. Dept. of Biochemistry, Egypt

THE ROLE OF CARBOHYDRATE MOIETY IN THE INTRACELLULAR DEGRADATION OF GLYCOPROTEINS. XVIII. THE DEGRADATION OF DEOXYRIBONUCLEASE

SUMMARY

The kinetics of tryptic digestion of bovine pancreatic deoxyribonuclease I after incubation with α-mannosidase and N-acetylglucosaminidase was investigated. The proteolysis was followed by determining the DNase activity in agarose gel by the radial diffusion method. It was found that the 1—2 residues of mannose hinder the full expression of DNase activity since by removing them there is an increase in enzyme activity and its stability in solution. We have also shown that the presence of N-acetylglucosamine is responsible for an increased resistance to proteolysis. The role of sugar moiety in modulating the DNase activity in the intestines is discussed.

BIBLIOGRAFIE

1. M. KUNITZ, J. Gen. Physiol., **33**, 349 (1950).
2. U. LINDBERG, Biochemistry, **6**, 335 (1967).
3. P. A. PRICE, T. Y. LIU, W. H. STEIN, S. MOORE, J. Biol. Chem., **244**, 917 (1969).
4. S. N. ZIMMERMAN, G. SANDEEN, Anal. Biochem., **14**, 269 (1966).
5. P. A. PRICE, J. Biol. Chem., **247**, 2895 (1972).
6. T. L. POULOS, P. A. PRICE, J. Biol. Chem., **247**, 2900 (1972).
7. B. J. CATLEY, S. MOORE, W. H. STEIN, J. Biol. Chem., **244**, 933 (1969).
8. A. NEUBERGER, R. D. MATSHALL, în *Symposium on Foods: Carbohydrates and their Roles*, sub red. H. W. SCHULTZE, R. F. CAIN, R. W. WROTSTAND, Avi, Westport, Connecticut, 1969. p. 115.
9. C. DE DUVE, P. WATTIAUX, P. BAUDHUIN, Advanc. Enzym., **24**, 291 (1962).
10. K. AGRAVAL, OM P. BAHL, J. Biol. Chem., **243**, 103 (1968).
11. J. FINDALLY, G. A. LEVVY, C. A. MARSH, Biochem. J., **69**, 467 (1958).

12. L. K. TADROS, D. ANDREI, C. MOTAŞ, St. cerc. biochim., **25**, 59 (1982).
13. W. B. SCHILL, G.F.B. SCHUMACHER, Anal. Biochem., **46**, 502 (1972).
14. C. MUŞOLAN, S. VASU, St. cerc. biochim., **20**, 209 (1977).
15. P. A. PRICE, J. Biol. Chem., **247**, 2895 (1972).
16. T. L. POULOS, P. A. PRICE, J. Biol. Chem., **247**, 2900 (1972).
17. G. L. EICHHORN, P. CLARCK, E. TARIEN, J. Biol. Chem., **244**, 937 (1969).
18. T. E. HUGHI, W. H. STEIN, J. Biol. Chem., **246**, 7191 (1971).
19. T. H. LIAO, J. SALNIKOV, S. MOORE, W. H. STEIN, J. Biol. Chem., **248**, 1489 (1973).
20. P. A. PRICE, S. MOORE, W. H. STEIN, J. Biol. Chem., **244**, 924 (1969).
21. T. E. HUGHI, J. Biol. Chem., **248**, 1712 (1973).
22. T. H. LIAO, J. Biol. Chem., **250**, 3831 (1975).
23. R.TORONSENS, P. STAHL, Biochem. J., **194**, 209 (1981).
24. A. FROUIN, P. GERARD, C. R. Seances Soc. Biol., **72**, 98 (1912).

DETERMINAREA SPECTROFOTOMETRICĂ A CONCENTRAȚIEI ÎN ACIZI REZINICI DIN RĂȘINA DE PIN

CLAUDIA EVELINA BUDU, C. D. SIMON

Rezumat. Determinarea spectrofotometrică a concentrației în acizi rezinici din rășina de pin se bazează pe proprietatea acestora de a forma un compus colorat în prezența Cu^{2+}, cu absorbție maximă la 675 nm. Evaluarea concentrației în acizi rezinici din rășină s-a făcut cu ajutorul unei curbe de etalonare, calibrată utilizînd concentrații diferite de acid abietic. Izomerizarea rășinii native a fost realizată prin tratare cu acid acetic glacial și pusă în evidență prin spectrometrie în UV. Produsele izomerizate obținute, colorate în condiții identice ca rășina nativă, prezintă același maxim de absorbție, la 675 nm.

Principalele componente ale rășinii sînt terebentina și colofoniul. Colofoniul este constituit în cea mai mare parte dintr-un amestec de acizi rezinici, care au aceeași formulă moleculară : $C_{20}H_{30}O_2$. În afară de acizii rezinici, din compoziția colofoniului mai fac parte, în cantități mici, acizi grași, substanțe oxidate nesaponifiabile, anhidride, fenoli (1), (2). Acizii rezinici sînt substanțe instabile care se izomerizează ușor prin încălzire cu acizi, trecînd sub forma mai stabilă de acid abietic (3).

Compoziția procentuală în acizi rezinici a rășinii de pin (*Pinus silvestris*), specie reziniferă de bază din Europa de est, este : acid abietic 22%, acid neoabietic 20%, acid palustric 25%, acid dehidroabietic 6%, acid pimaric 5%, acid izopimaric 17% (2).

Exprimarea aciditații rășinii se face de obicei prin determinarea indicelui de aciditate (4).

Determinarea spectrofotometrică a acizilor rezinici se bazează pe capacitatea acestora de a forma cu Cu^{2+} săruri colorate, solubile în cloroform, iar intensitatea coloratiei soluției cloroformice, citită la 675 nm, este proporțională cu concentrația.

Metoda este sensibilă în limite de concentrație ale acizilor rezinici cuprinse între 0,008 și 0,004 M (5).

În lucrarea de față ne-am propus determinarea spectrofotometrică a concentrației în acizi rezinici din rășina de pin nativă și izomerizată.

MATERIAL ȘI METODE

Calibrarea curbei etalon. Curba de etalonare a fost calibrată, utilizînd concentrații de acid abietic cuprinse între 0,6 și 10 mg/ml în alcool metilic.

Din soluțiile menționate, 10 ml s-au adus la pH alcalin (în jurul valorii 9), prin adăugarea a 2 ml soluție KOH metanolic 0,1 N.

Reacția de culoare s-a efectuat utilizînd o soluție de azotat de cupru 2%, după metoda descrisă de B. Kakáč și Z. J. Vejdělek (5). Astfel, probe a cîte 5 ml s-au tratat cu 10 ml azotat de cupru 2%, 10 ml cloroform și 5 ml apă distilată. După separarea fazelor, s-a măsurat absorbanța fazei cloroformice la 675 nm.

Pregătirea materialului de analizat. S-a lucrat cu răşină proaspătă obţinută de la speciile *Pinus silvestris* şi *Pinus nigra*. Probe de răşină a cîte 10 ml, diluate la 0,08% cu alcool metilic, s-au tratat cu 2 ml soluţie KOH metanolic 0,1 N.

Izomerizarea răşinii native. S-au tratat cu acid acetic glacial 3 g răşină de pin, în experimente diferite, cu 1 ml (răşină izomerizată I), respectiv 1,5 ml (răşină izomerizată II). Probele s-au menţinut pe baia de apă timp de 4 ore la 100°C.

Izomerizarea răşinii, în scopul îmbogăţirii ei în acid abietic, a fost confirmată prin compararea spectrelor UV ale soluţiilor de acid abietic 0,0015%, răşină nativă 0,0034%, răşină izomerizată I şi răşină izomerizată II 0,0034% în alcool metilic. Au fost efectuate de asemenea înregistrările spectrelor în vizibil ale produşilor coloraţi obţinuţi, conform metodei descrise anterior, din soluţii 0,06 g% de acid abietic, răşină nativă şi răşină izomerizată II în alcool metilic.

Înregistrările s-au făcut la un spectrofotometru UV-VIS Carl Zeiss, Jena.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Din curba de etalonare în domeniul concentraţiilor de acid abietic menţionate s-a constatat o dependenţă lineară a absorbanţei cu concentraţia, aşa cum se constată din figura 1.

Este cunoscut faptul că spectrele în UV ale diferiţilor acizi rezinici prezintă diferenţe considerabile (6), (7), (8).

În condiţiile utilizării metodei adaptate de noi, spectrele în vizibil ale produşilor coloraţi, obţinuţi din acidul abietic pur şi din amestecul de acizi rezinici ai răşinii native şi izomerizate, sînt comparabile.

Rezultă deci (fig. 2) că la 675 nm există acelaşi maxim de absorbţie atît pentru acidul abietic, cît şi pentru ceilalţi acizi rezinici, fapt care a

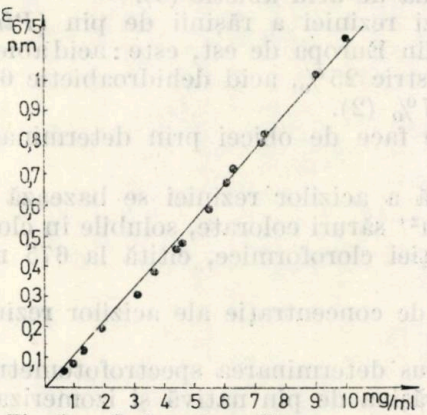


Fig. 1. — Curba de calibrare pentru acizii rezinici.

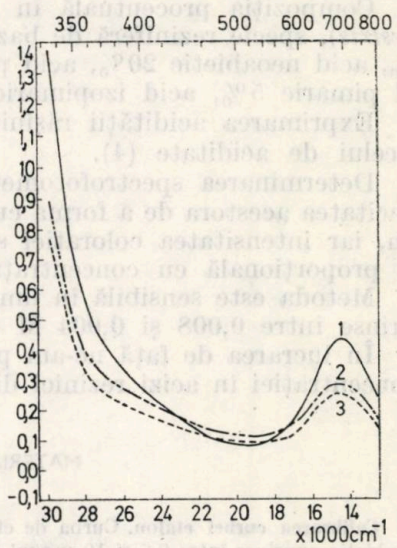


Fig. 2. — Spectrele în vizibil ale produşilor coloraţi, rezultate prin tratarea acizilor rezinici cu $Cu(NO_3)_2$: *1*, acid abietic pur; *2*, răşină nativă; *3*, răşină izomerizată.

justificat folosirea acidului abietic la calibrarea curbei etalon, în scopul determinării concentraţiei amestecului de acizi rezinici din răşina de pin,

Prin tratarea răşinii native cu acidul acetic glacial s-au produs, în urma izomerizării, modificări structurale cu formarea probabilă a acidului abietic, aşa cum se constată din spectrele UV ale răşinii tratate, asemănătoare cu spectrul UV al acidului abietic (fig. 3).

Pentru a verifica transformarea diferiţilor acizi rezinici, componenţi ai răşinii, în acid abietic, s-au determinat şi raporturile absorbanţe-

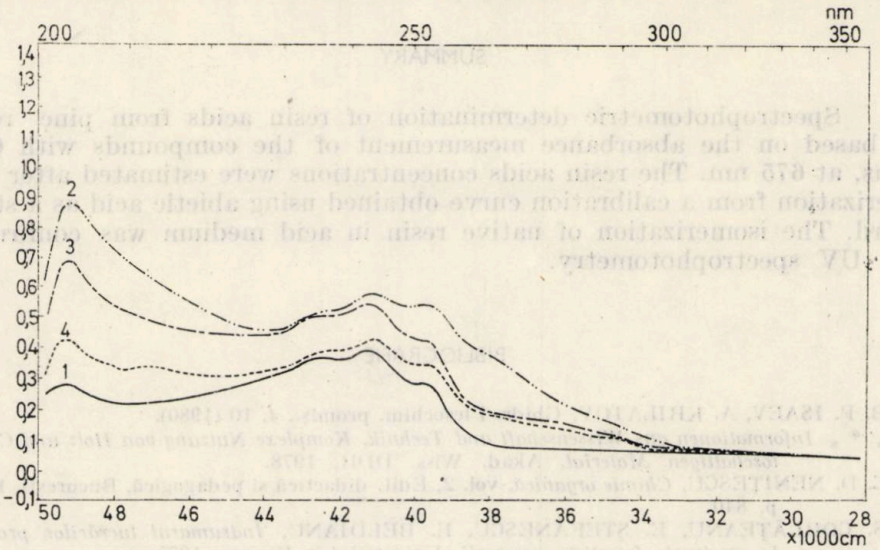


Fig. 3. — Spectrele în UV ale amestecului de acizi rezinici: *1*, acid abietic pur; *2*, răşină nativă; *3*, răşină izomerizată I; *4*, răşină izomerizată II.

lor la anumite lungimi de undă la care acidul abietic prezintă absorbanţe relativ ridicate.

Tabela 1

Raporturile absorbanţelor în UV la diferite lungimi de undă ale acidului abietic pur şi amestecului de acizi rezinici

Raporturile absorbanţelor	Acid abietic pur	Răşină nativă	Răşină izomerizată I	Răşină izomerizată II
$\frac{A_{243}}{A_{203}}$	1,39	0,66	0,79	1,00
$\frac{A_{243}}{A_{236}}$	1,08	1,13	1,05	1,10
$\frac{A_{243}}{A_{252}}$	1,39	1,07	1,28	1,23

Aşa cum se poate observa din tabela 1, raporturile dintre absorbanţele la lungimile de undă menţionate în cazul răşinii izomerizate sînt mult mai apropiate de cele ale acidului abietic pur, faţă de cele obţinute în cazul răşinii native. Acest fapt pledează pentru ipoteza că produsul de izomerizare este reprezentat de acidul abietic.

Prezentat la redacţie
la 17 iulie 1982

Institutul de cercetări şi amenajări silvice,
Filiala Braşov,
Laboratorul de genetică,
2200 Braşov, str. Cloşca nr. 13

SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF RESIN ACIDS FROM NATIVE PINE RESIN

SUMMARY

Spectrophotometric determination of resin acids from pine resin is based on the absorbance measurement of the compounds with Cu^{II} ions, at 675 nm. The resin acids concentrations were estimated after isomerization from a calibration curve obtained using abietic acid as a standard. The isomerization of native resin in acid medium was confirmed by UV spectrophotometry.

BIBLIOGRAFIE

1. B. P. ISAEV, A. KRILATOV, Ghidr. i lesochim. promiș., *4*, 10 (1980).
2. * * * *Informationen aus Wissenschaft und Technik, Komplexe Nutzung von Holz und Celluloschaltigen Material*, Akad. Wiss. DDR, 1978.
3. C. D. NENIȚESCU, *Chimie organică*, vol. 2, Edit. didactică și pedagogică, București, 1974, p. 840.
4. S. CORLĂȚEANU, E. ȘTEFĂNESCU, E. BELDIANU, *Îndrumarul lucrărilor practice la produsele forestiere accesorii*, Universitatea Brașov, 1975.
5. B. KAKÁČ, Z. J. VEJDĚLEK, *Handbuch der photometrichen Analyse organischer Verbindungen*, vol. 1, Verlag Chemie GmbH, Weinheim, 1974, p. 338.
6. G. HARRIS, T. F. SANDERSON, J. Amer. Chem. Soc., **70**, 334 (1948).
7. W. SANDERMANN, *Terpintenöle Tallöl*, Springer Verlag, Berlin—Göttingen—Heidelberg, 1960.
8. I. MELCER, A. BLAŽEV, L. ŠUTÝ, *Analytická Chémia Dreva*, Alfa, Bratislava, 1976, p. 316.

IZOLAREA ŞI CARACTERIZAREA UNUI FACTOR ANTIVIRAL OBŢINUT PRIN EXTRACŢIA FENOLICĂ A COLOSTRULUI UMAN

LUCIA BUZILĂ

Rezumat. Din colostru uman s-a obţinut prin extracţie fenolică un factor antiviral, care a fost analizat şi caracterizat prin disc-electroforeză în poliacrilamidă (PAA) în mediu alcalin, cromatografie pe Con A Sepharose, imunoelectroforeză şi dublă difuzie. Nu este de natură imunoglobulinică. S-a evidenţiat ca o glicoproteină care prezintă o acţiune de reducere a titrului infectant la virusurile herpetic şi urlian.

Howard şi Fieldsteel au presupus existenţa în colostru a unei substanţe antivirale nespecifice pe lîngă anticorpii de tip IgA_s(1). Ea a fost asociată cu stratul lipidic al laptelui, fiind absentă din fracţiunea proteică asociată cu anticorpii antipolio evidenţiaţi de Sabin şi Fieldsteel (2).

Utilizînd virusul stomatitei veziculare, Matthews şi colab. semnalează, atît în laptele uman cît şi în cel bovin, o substanţă antivirală relativ stabilă la căldură (3). Componenta a prezentat o activitate antivirală şi pentru următoarele virusuri: Influentza, Rhinovirus, Echo- şi Reovirus, demonstrînd că factorul activ nu era nici anticorp, nici lactoferină, nici interferon, nici lizozim.

Thouless şi colab., întrebuinţînd acelaşi factor glicoproteic, au obţinut neutralizarea Rotavirusului uman şi a celui de miel, menţionînd totodată obţinerea lui din lapte prin extracţie cu fenol (4).

Deoarece autorii menţionaţi nu dau nici un fel de indicaţii asupra metodelor de preparare a factorului antiviral, ne-am propus o încercare de obţinere a lui prin extracţie fenolică. Preparatele obţinute au fost caracterizate fizico-chimic şi imunochimic, precum şi pentru activitatea antivirală.

MODUL DE LUCRU

S-a lucrat cu o soluţie fenolică saturată cu apă, care conţinea 80 g fenol la 100 ml soluţie (5).

Extracţia cu fenol a colostrului uman. După o serie de încercări, am ajuns la cea mai bună variantă utilizînd un colostru delipidat, decazeinificat şi dializat pe ser fiziologic 48 de ore cu o concentraţie proteică de 25 mg/ml. S-a pornit de la 80 ml colostru, raportul de extracţie fiind de o parte colostru la o parte fenol. După agitare 15 min la temperatura camerei, amestecul s-a centrifugat la rece 30 min la 5 000 rot/min. În eprubetă s-au separat trei straturi: un strat superior, limpede, apos; unul mijlociu, alb-lăptos; stratul inferior, care conţinea fenolul pur şi care a fost aruncat. Ulterior s-au prelucrat primele două straturi. Deoarece stratul de mijloc era tulbure, am practicat o extracţie vol/vol cu tampon fosfat 0,1 M, pH 7,5 + NaCl 9‰. Amestecul s-a agitat 15 min la temperatura camerei, după care a fost centrifugat la 5 000 rot/min. După centrifugare s-a prelucrat atît precipitatul (notat cu 3), cît şi supernatantul (notat cu 1). Probele au fost notate deci astfel: 1 — extractul stratului proteic din mijloc; 2 — stratul supe-

rior apos ; 3 — precipitatul stratului proteic din mijloc. Toate trei probele au fost tratate cu de 6 ori cîte 2 volume de eter pentru îndepărtarea fenolului, apoi au fost barbotate cu azot pentru îndepărtarea eterului și s-au concentrat pe polietilenglicol (PEG) 20 000. Concentrațiile proteice au fost 2,7 mg/ml la proba 1 și 8,4 mg/ml la proba 2. Proba 3 fiind un sediment, nu s-a făcut concentrația proteică.

Electroforeza în disc în poliacrilamidă (PAA) în mediu alcalin a fost realizată după Davis (6). Colorația pentru proteine și glucide s-a făcut utilizîndu-se metodele uzuale.

Imunoelectroforeza a fost făcută în agaroză 1 % după Scheidegger (7). S-a utilizat tamponul veronal pH 8,6 și $\mu = 0{,}05$.

Dubla difuzie a fost făcută, după Ouchterlony (8), în gel de agaroză 1 % în ser fiziologic

Serurile antialbumină umană, anti-IgG umană, anti-IgM umană și anti-IgA umană, ne-au fost livrate de către Institutul de seruri și vaccinuri „Dr. I. Cantacuzino".

Serurile anti-IgA_s și anticomponentă secretoare (SC) au fost preparate de noi (9), iar IgA_s și SC s-au făcut după metoda lui Newcomb (10) modificată de Mestecky (11).

Serurile antilactoferină, antilactoperoxidază, anti-α-lactalbumină și anticolostru s-au făcut după metoda noastră (9).

Cromatografia pe Con A Sepharose s-a făcut după Kennedy și Rosevear (12), utilizîndu-se o coloană de 16/1 cm cu tampon Tris 0,05 M, pH 7,5 cu $CaCl_2$ 0,01 M și Cl_2Mn 0,001 M. S-au colectat probe de cîte 2 ml la o viteză de eluție de 16 ml/oră. S-au introdus în coloană 10 mg proteină. După eluția primului pisc s-a aplicat o soluție de o-metil-D(+)-glucozid 5 % în apă distilată. Pentru eluare completă s-a aplicat în final un tampon borat 0,5 M, pH 9,05. Piscurile eluate au fost concentrate pe PEG.

Activitatea antiherpetică s-a determinat prin reacția de seroneutralizare comparativă (13) la Institutul de virusologie (Laboratorul dr. A. Mușiu). S-au utilizat culturi celulare de fibroblaste de embrion uman la pasajul 22 *in vitro* cu un mediu de cultură MEM cu 10 % ser vițel și kanamicină 10 γ/ml. S-a lucrat cu virus herpes simplex tip I UR_3. Titrul infectant a fost calculat după metoda Spearmann-Karbert. Aprecierea activității antivirale s-a calculat în raport cu martorul.

Determinarea activității virusului urlian s-a făcut la Institutul de virusologie „Șt. S. Nicolau" (Laboratorul dr. Iolanda Copelovici) (14).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Electroforeza în disc în PAA în mediu alcalin este prezentată în figura 1.

La toate cele trei probe se observă spre polul anodic prezența unei benzi proteice. La colorația pentru glucide, intensitatea aceleiași benzi descrește de la proba 2 la 3 și apoi la 1. Fiind foarte puternică la proba 2, ea pare că depășește fracțiunea proteică. Se cunoaște acțiunea antimicrobiană a lactoperoxidazei, care se știe că este o glicoproteină. De aceea am dorit să vedem dacă nu cumva fracțiunea glucidică din preparatele noastre corespunde fracțiunii glucidice a lactoperoxidazei. Din figura 1, *4* se observă că lactoperoxidaza migrează foarte puțin de la start. Se află în jumătatea superioară a tubului și nici proteina, nici glucidul ei nu corespund proteinei și glucidului din probele noastre. Deci, în preparatul nostru nu avem lactoperoxidază.

Imunoelectroforeza este dată în figura 2.

Probele 1 și 2 nu răspund cu nici unul din antiserurile utilizate de noi. În schimb, proba 3 dă linii de precipitare cu aproape toate serurile imune utilizate, demonstrînd precipitarea majorității proteinelor la tratarea cu fenol.

Dubla difuzie s-a realizat cu aceleași antiseruri și este dată în figura 3.

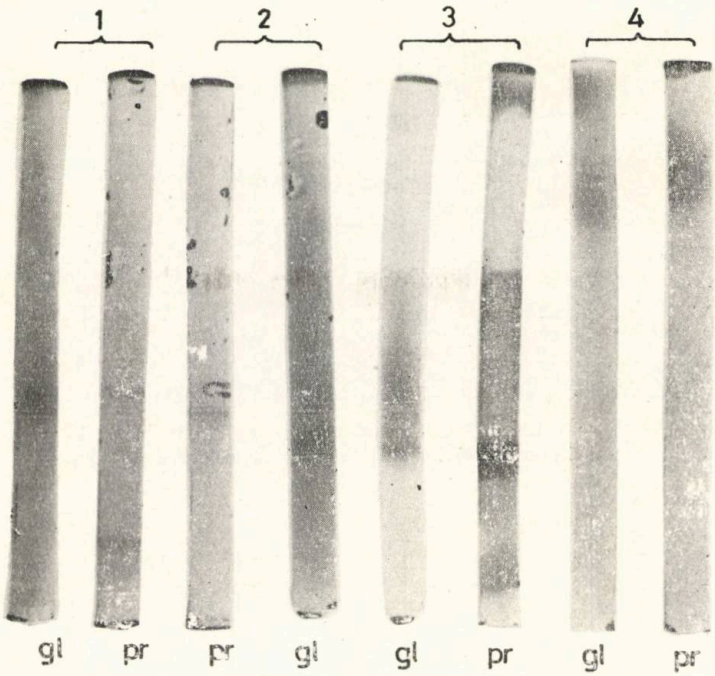


Fig. 1. — Electroforeza în PAA în mediu alcalin a preparatelor obținute la extracția cu fenol: 1 = extractul stratului proteic din mijloc; 2 = stratul superior apos; 3 = precipitatul stratului proteic din mijloc; 4 = lactoperoxidază; gl = colorație glucide; pr = colorație proteine.

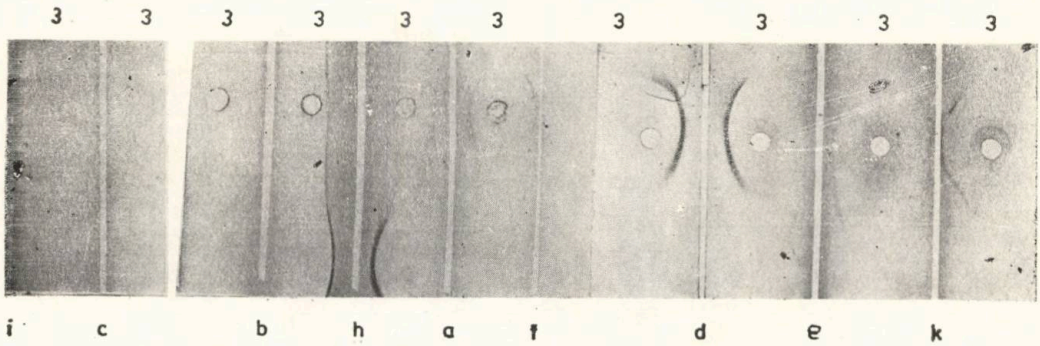


Fig. 2. — Imunoelectroforeza preparatelor obținute la extracția cu fenol a probei 3: a = ser anti-IgA uman; b = ser anti-IgG uman; c = ser anti-IgM uman; d = ser anti-imunoglobulina A secretoare; e = ser anti-lactoferină; f = ser anti-lactoperoxidază; g = ser anti-componentă secretoare; h = ser anti-albumină umană; i = ser anti-α-lactalbumină; k = ser anti-colostru.

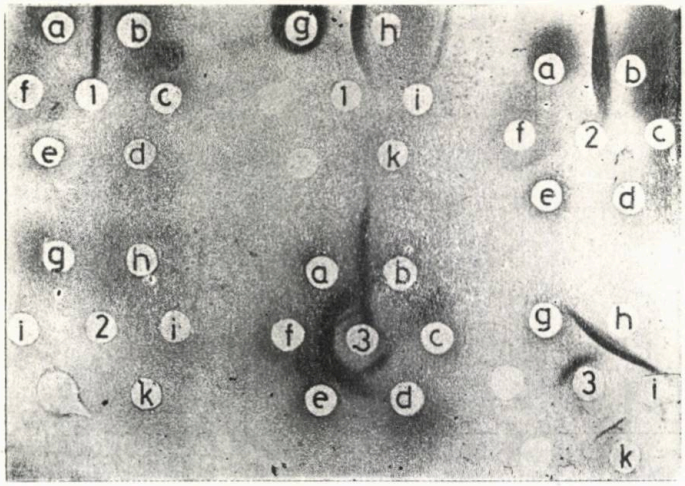


Fig. 3. — Dubla difuzie a celor 3 probe din fig. 1. Notațiile probelor și ale antiserurilor sînt identice cu cele din fig. 1 și 2.

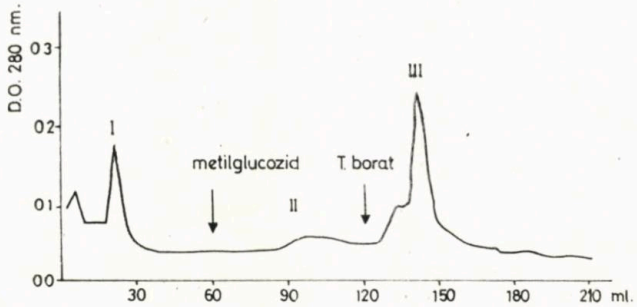


Fig. 4. — Cromatografia pe Con A Sepharose a probei 2.

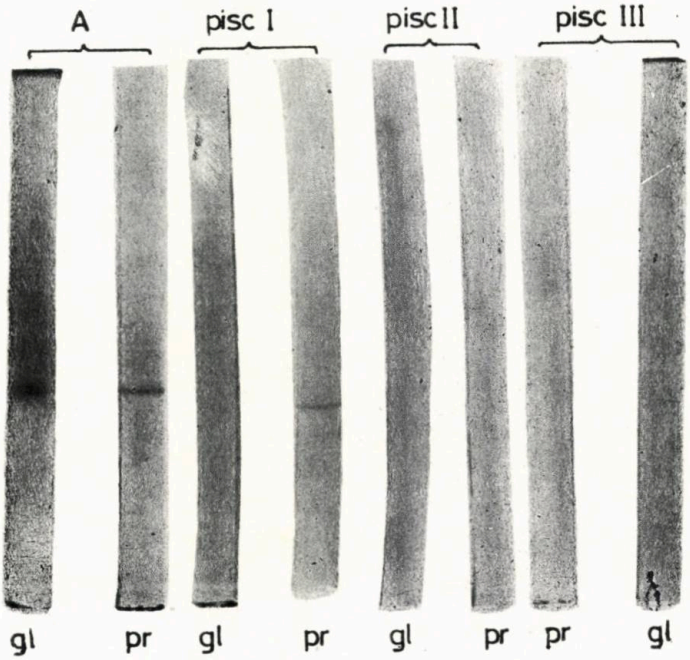


Fig. 5. — Electroforeza în PAA în mediu alcalin a piscurilor obținute la cromatografia pe Con A Sepharose.

Probele 1 și 2 nu dau reacții de precipitare cu nici unul din serurile imune, poate doar o slabă linie de precipitare cu serul anticolostru (K) la proba 1. În schimb, proba 3 reacționează cu toate serurile imune, confirmînd rezultatele de la imunoelectroforeză.

Probele 1 și 2 au fost date pentru testarea activității antivirale la Institutul de virusologie „Șt. S. Nicolau".

Deoarece proba 2 s-a dovedit a fi o glicoproteină, am încercat purificarea ei pe Con A Sepharose în speranța de a obține factorul antiviral semnalat (3), (4).

Cromatografia pe Con A Sepharose este prezentată în figura 4. Înălțimea celor trei piscuri cromatografice obținute denotă absența unei glicoproteine specifice de manoză (piscul 2 foarte mic), prezența unor proteine neadsorbite (piscul 1) și a unei glicoproteine puternic adsorbite de Sepharose (piscul 3 eluat cu tampon borat).

Electroforeza în PAA a celor trei piscuri este arătată în figura 5. Se observă că piscul 1 prezintă o diagramă asemănătoare soluției inițiale atît din punctul de vedere al proteinelor, cît și al glucidelor. În piscurile 2 și 3 sînt glicoproteine cu greutăți moleculare mici, cu parte proteică foarte puțină, în schimb cu multe glucide.

Activitatea antivirală pe virusurile herpetic și urlian s-a determinat la Institutul de virusologie atit pentru probele 1 și 2, cît și pentru cele trei piscuri obținute la cromatografia pe Con A Sepharose.

Proba 2 a condus la o reducere de 100 de ori a titrului de infectivitate la virusul herpetic, iar piscul 1 de la Con A Sepharose a prezentat o acțiune antivirală asupra virusului urlian.

Din aceste rezultate reiese faptul că factorul antiviral semnalat ca o glicoproteină (3), (4) se poate obține în condițiile prezentate de noi în faza apoasă limpede a extractului fenolic. Cromatografia pe Con A Sepharose purifică componenta, îndepărtînd o serie de alte componente glicoproteice cu greutăți moleculare mici.

CONCLUZII

Prin extracția fenolică a colostrului uman se obține în faza apoasă impede un factor glicoproteic antiviral, care a fost purificat prin cromatografie pe Con A Sepharose.

Aduc mulțumiri și pe această cale dr. Iolanda Copelovici și dr. Adrian Mutiu de la Institutul de virusologie „Șt. S. Nicolau" pentru amabilitatea de a pune în evidență activitatea antivirală a produsului nostru. De asemenea aduc mulțumiri colegelor mele Florica Chelu pentru serul anti-α-lactalbumină și Eugenia Pandele pentru serul antilactoperoxidază pe care mi le-au pus la dispoziție.

Prezentat la redacție
la 6 decembrie 1982

Institutul de științe biologice,
Laboratorul de imunochimie,
București, Splaiul Independenței nr. 296

ISOLATION OF AN ANTIVIRAL FACTOR BY PHENOL EXTRACTION AND ITS CHARACTERIZATION

SUMMARY

The preparation and physico-chemical characterization of an antiviral factor from the human colostrum are described. This product was isolated by phenol extraction and characterized by polyacrylamide disc-electrophoresis, Con A Sepharose chromatography, immunoelectrophoresis and double diffusion. The product is a glycoprotein devoid of immunoglobulin activity. It was evidenced that our product has in vitro antivirol activity against the urlian and herpetic viruses.

BIBLIOGRAFIE

1. A. HOWARD, A. H. FIELDSTEEL, Cancer Research, **34**, 712 (1974).
2. A. B. SABIN, A. H. FIELDSTEEL, Pediatrics, **29**, 105 (1962).
3. T.H.J. MATTHEWS, H. K. LAWRENCE, C.D.C. NAIR, A. J. TYRRELL, Lancet, **2**, 1387 (1976).
4. M. E. THOULESS, A. S. BRYDEN, T. A. FLEWETT, Brit. Med. J., **2**, 1390 (1977).
5. R. PORTOCALĂ, L. POPA, *Acizi ribonucleici celulari şi virali*, Edit. Academiei, Bucureşti, 1966, p. 321.
6. B. J. DAVIS, N. Y. Acad. Sci., **121**, 373 (1964).
7. J. SCHEIDEGGER, Int. Arch. Allergy, **7**, 103 (1955).
8. O. OUCHTERLONY, Acta Path. Scand., **32**, 231 (1953).
9. L. BUZILĂ, C. MOTAŞ, St. cerc. biochim., **22**, 3 (1979).
10. R. W. NEWCOMB, D. NORMANSELL, D. R. STANDWORTH, J. Immunol., **101**, 905 (1968).
11. J. MESTECKY, R. KULHAVY, F. KRAUS, J. Immunol., **108**, 738 (1972).
12. J. F. KENNEDY, A. ROSEVEAR, J. Chem. Soc. Perblim. Trans. (I), **19**, 2041 (1973),
13. * * * *Metodele laboratorului clinic*, Edit. medicală, Bucureşti, 1964, p. 1027.
14. I. COPELOVICI, L. TELEGUŢĂ, R. NICULESCU, A. EREMIA, C. MOTAŞ, L. BUZILĂ C. MIHAIL, S. HULEA, Rev. roum. Virol., **34**, *1* (1982).

FACTORUL DE CREȘTERE A NERVULUI. PROPRIETĂȚI BIOLOGICE ȘI ENZIMATICE

ELENA GANEA, ELISABETA MIHĂILESCU, RODICA BÎRNESCU, PAULA PRUNESCU, C. PRUNESCU

Rezumat. Factorul de creștere a nervului (NGF) s-a izolat din glandele submaxilare de șoarece și s-a purificat prin gel-filtrare pe Sephadex G-100 și cromatografie pe DEAE-celuloză. Caracterizarea produșilor obținuți în diferite etape de preparare s-a realizat prin disc-electroforeza în gel de poliacrilamidă în mediu alcalin și acid. Activitatea biologică a NGF s-a testat *in vivo*. Prin metode microanatomice și histologice s-a demonstrat, la animalele injectate, creșterea dimensiunilor ganglionilor nervoși simpatici, a volumului nucleilor, a numărului nucleolilor și a grosimii stratului de citoplasmă. S-a testat prezența activității esterazice a NGF pe substratul TAME, activitate ce crește pe intervalul de pH 6—9. S-a evidențiat de asemenea existența unei activități proteazice a NGF asupra cazeinei la pH 9 prin metoda difuziei radiale.

Factorul de creștere a nervului (NGF) este o proteină complexă, necesară dezvoltării și supraviețuirii neuronilor sistemului nervos simpatic și a unor neuroni senzitivi. Prezența lui a fost detectată la vertebrate în cantități foarte mici, într-o mare varietate de țesuturi (1), (2), (3), (4), (5), (6). În cantități mari se găsește în glandele submaxilare de șoarece (7), în veninul unor șerpi veninoși (8) și în glanda prostată de cobai (9), acestea fiind principalele surse de separare și purificare. La om, NGF s-a izolat și purificat recent din placentă la termen (3). În funcție de sursa de obținere și de procedeul de separare utilizat, s-au obținut diverse forme moleculare de NGF. Din glandele submaxilare de șoarece au fost purificate două forme moleculare principale, denumite, după constantele lor de sedimentare, 7 S-NGF și 2,5 S-NGF.

În afară de aceste două forme, recent s-a izolat din glanda submaxilară de șoarece o proteină NGF cu greutate moleculară de 116 000, denumită HMW-NGF (10), asemănătoare cu 7 S-NGF, singura diferență fiind stabilitatea mai mare în soluții diluate a proteinei menționate.

7 S-NGF, având o greutate moleculară de 140 000, este un complex format din trei tipuri de subunități, denumite α, β și γ (11). Dintre aceste subunități, numai componenta β stimulează creșterea neuritelor la neuronii ganglionari în culturi de celule (12). Componenta γ prezintă activitate esterazică pe anumite substrate sintetice conținînd arginină (13). Rolul componentei α este încă necunoscut. Se pare că ea reglează activitatea celorlalte două subunități (14).

Existența în cadrul aceleiași molecule a două acțiuni contrare, sinteză și degradare, ne-a suscitat interesul, constituind punctul de plecare al acestei lucrări. Ținînd seama de heterogenitatea datelor din literatură privind activitatea NGF, efect datorat în mare parte diversității metode-

lor de preparare, ne-am propus în cele ce urmează alegerea unei metode optime de izolare şi purificare a NGF, precum şi caracterizarea fizico-chimică, biologică şi enzimatică a produsului obţinut.

MATERIALE ŞI METODE

Prepararea şi purificarea factorului de creştere a nervului. S-au disecat glandele submaxilare de la şoareci adulţi masculi (Swiss albino) şi s-au păstrat îngheţate pînă în momentul luării în lucru. Separarea şi purificarea NGF s-au efectuat după metoda descrisă de Varon şi colab. (12), urmînd în general etapele figurate în schema de mai jos :

glande submaxilare
↓
omogenizare
tampon Tris-HCl 0,025 M, pH 7,4
↓
centrifugare
30 min 50 000 g
↓
supernatant
liofilizare
↓
gel-filtrare
Sephadex G-100
Tris-HCl 0,05 M, pH 7,4
↓
cromatografie
DEAE-celuloză
Tris-HCl 0,05 M, pH 7,4
NaCl : 0,01 M, 0,08 M
şi 0,3 M
↓
gel-filtrare
Sephadex G-150

Electroforeza în gel de poliacrilamidă a piscurilor proteice obţinute în cursul purificării NGF s-a realizat atît în mediul alcalin, după metoda lui Davis (15), cît şi în mediul acid, după Reisfeld şi colab. (16).

Activitatea biologică a NGF s-a testat *in vivo* prin metoda indicată de Montalcini şi Angeletti în 1968 (7).

Pui de şoarece, masculi şi femele, în vîrstă de 3 zile, au fost injectaţi zilnic, subcutan, cu cîte 15 μg proteină NGF/g greutate corporală, timp de 8 zile, după care puii trataţi, ca şi martorii, au fost sacrificaţi prin decapitare.

Fragmente de lanţuri ganglionare simpatice, cuprinse între ganglionul stelat şi celiac, au fost disociate de ţesuturile adiacente.

Prepararea „in toto" a ganglionilor vegetativi simpatici. Lanţurile ganglionare explantate au fost fixate în formol salin neutru 10% timp de 2—3 ore, impregnate cu O_5O_4 1% în tampon fosfat pH 7,2 timp de 20 ore, spălate în ser fiziologic, deshidratate în băi succesive de alcool de 70°, 96° şi alcool absolut şi clarificate în două băi succesive de xilen.

Lanţurile ganglionare astfel preparate s-au montat în balsam de Canada şi s-au examinat la stereomicroscop.

Preparate histologice. Preparate histologice s-au realizat atît prin secţionarea ganglionilor simpatici izolaţi din animale, cît şi prin secţionarea lor *in situ* după prelevarea şi fixarea porţiunilor corespunzătoare din corpul şoarecilor (zona toracică, lombo-renală). Tehnica histologică folosită a constat din fixarea în formol salin neutru 10% sau în amestec Bouin-Holland.

După spălările și deshidratarea de rutină, piesele au fost incluse în parafină și secționate la microtom la o grosime de 5 μ. Secțiunile au fost colorate cu hemalaun acid Mayer-eozină sau cu tehnica Ziehl-fucsină carbolică-Tween 80, pentru evidențierea lipofuscinelor.

Activitatea enzimatică. *Activitatea pe substrat sintetic* s-a determinat după Young (17), folosind ca substrat TAME. Alicote dintr-o soluție de NGF purificat (0,2 mg/ml) s-au diluat cu tampon avînd diferite valori de pH pînă la concentrația maximă de 2 μg/ml. Incubarea s-a desfășurat la 25°C timp de 0—60 min, în prezența a 20 μl TAME 0,1 M, înregistrîndu-se modificarea absorbției la 247 nm, în timp, față de proba martor conținînd 20 μl substrat în același tampon ca și proba cu enzimă.

Activitatea pe substrat proteic s-a determinat printr-o modificare a metodei de difuzie radială descrisă de Schill și Schumacher (18). Difuzia s-a realizat în gel de agar 1% conținînd cazeină 0,1% în tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 9, timp de 24—48 de ore la 37°C, urmată de fixarea cu TCA 12,5% timp de o oră, spălarea excesului de TCA, uscare, colorare cu Amido-black și îndepărtarea excesului de colorant cu acid acetic 3%.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Izolarea și purificarea NGF

Dintre metodele de preparare a NGF descrise pînă în prezent, am ales metoda lui Varon și colab. (12) pentru următoarele motive: are ca rezultat obținerea 7 S-NGF, care conține în structura sa și fracțiunea γ, enzimatic activă. Prin metoda lui Bocchini și Angeletti (19) se poate prepara 2,5 S-NGF, compus biologic activ, dar fără acțiune enzimatică, acesta fiind de fapt fracțiunea β, care în timpul separării a suferit un proces de proteoliză limitată la ambele capete (N- și C-terminal). Metoda lui Young (17) conduce, ca și cea folosită de noi, la obținerea unui produs NGF de greutate moleculară mare (HMW-NGF), conținînd cele trei subunități α, β și γ, dar randamentul acestei metode este de 10 ori mai mic decît cel al metodei lui Varon. La gel-filtrarea pe Sephadex G-75 s-au obținut trei piscuri. Partea descendentă a primului pisc a fost separată pe DEAE-celuloză. Cel de-al doilea pisc conține, conform datelor lui Varon și colab. (12), 70% din activitatea totală a NGF. Deoarece purificarea ulterioară a acestui pisc prin gel-filtrare pe Sephadex G-150 presupunea concentrarea sa și ținînd seama de datele din literatură privind pierderea unei părți din activitate la concentrarea prin dializă, sub presiune sau liofilizare, ne-am oprit la această etapă de purificare. Randamentul corespunzător diferitelor etape de purificare parcurse pentru un experiment este figurat mai jos:

țesut umed greutate totală	1118	mg
supernatant omogenat centrifugat	244	mg proteină
piscul I descendent Sephadex G-100. . .	48	mg proteină
piscul II DEAE-celuloză	11,35	mg proteină

Caracterizarea electroforetică pe gel de poliacrilamidă a piscurilor proteice obținute în cursul purificării NGF este ilustrată în figurile 1—3, pentru migrare în mediul alcalin și acid.

Imaginea electroforetică a NGF constă în benzi proteice datorate atît 7 S-NGF, cît și celor trei tipuri de subunități componente: α, cu proprietăți acide, migrează spre anod; β, cu proprietăți bazice, migrează aproape de start, iar γ, fracțiune neutră. Aspectul electroforetic relevat se datorește faptului că pH-ul tamponului de migrare este 8, ceea ce

reprezintă limita intervalului de stabilitate pentru 7 S-NGF. Echilibrul existent între 7 S-NGF şi subunităţile componente duce la evidenţierea electroforetică atît a complexului, cît şi a componentelor. Piscul proteic conţinînd NGF (I descendent) de pe Sephadex (fig. 1, *b*) conţine benzi, dintre care o parte dispar în urma purificării pe DEAE-celuloză.

Se observă de asemenea prezenţa mai multor benzi corespunzînd fracţiunii α. Heterogenitatea subunităţilor α şi γ este unanim recunoscută, dar se pare că ea nu provine din etapele de purificare şi nici nu este legată de sursa de ţesut, cum se admitea în general, ci este o caracteristică a NGF. În acest sens, Smith şi Varon (20) au arătat că, lucrînd pe un singur lob de glandă submaxilară izolată de la un singur şoarece, heterogenitatea se menţine.

Pentru o caracterizare mai detaliată s-a efectuat şi electroforeza fracţiunilor menţionate, în mediul acid (fig. 3). Se observă că numai o parte din piscuri prezintă o separare netă a proteinelor. Astfel, piscul II DEAE-celuloză (NGF) prezintă benzi bine evidenţiate, banda cu migrare catodică fiind probabil datorată componentei (fig. 3).

Activitatea biologică a NGF

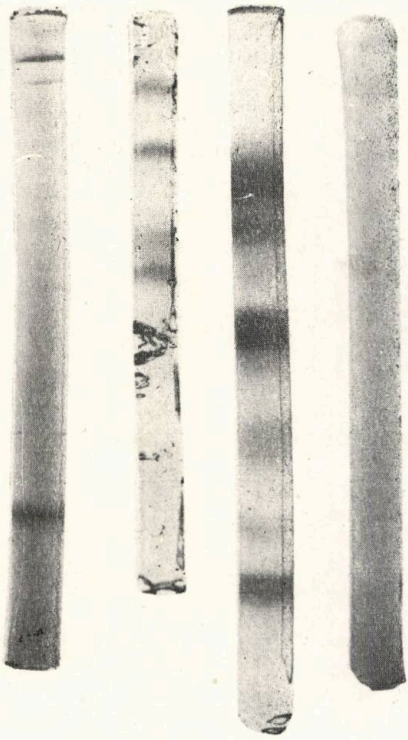
Observaţii microanatomice. Administrarea NGF într-o primă etapă de purificare (pisc I d Sephadex) nu a relevat deosebiri semnificative între ganglionii vegetativi ai animalelor tratate şi ai celor netratate. Lipsa exprimării activităţii biologice a NGF s-ar putea datora contaminării proteinei, legării acesteia de unele componente ale serului cu greutate moleculară mare, componente care pot avea un rol inhibitor, servind la menţinerea unui nivel constant de NGF liber *in vivo*. Rolul acestor componente speciale din ser poate fi reglator şi/sau protector; adesea, această legare la NGF interferă cu detectarea proteinei în ser sau în alte surse (4), (21), (22). Purificarea ulterioară a produsului NGF are ca rezultat manifestarea acţiunii sale biologice specifice asupra neuronilor simpatici receptivi.

Astfel, rezultatele obţinute cu acest preparat au evidenţiat faptul că ganglionii simpatici ai animalelor tratate cu opt doze şi sacrificate imediat după încetarea tratamentului au dimensiunile crescute (tabela 1, fig. 4 şi 5) în raport cu ganglionii simpatici ai animalelor de control.

De asemenea, cordoanele simpatice ale lanţului ganglionar paravertebral sînt mult îngroşate în raport cu structurile similare de la martori, ceea ce este în concordanţă cu rezultatele din literatură (7), (23), (24), care au demonstrat că introducerea unor cantităţi suprafiziologice de NGF în circulaţia animalelor nou-născute produce o masivă proliferare a fibrelor nervoase simpatice şi o hipertrofie a pericarionilor.

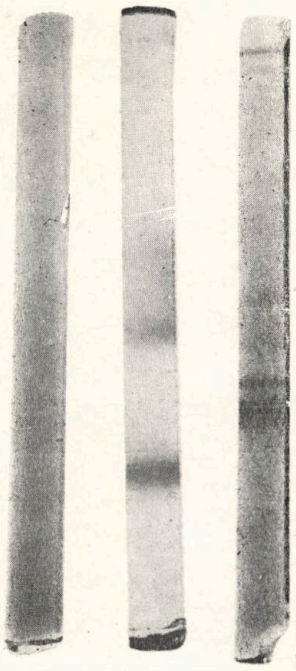
Cercetări recente (25) au demonstrat că această creştere în volum a ganglionilor simpatici se datoreşte efectelor biologice ale NGF, de reglare a supravieţuirii simpatoblastelor în timpul dezvoltării lor ontogenetice şi de creştere a troficităţii neuronilor simpatici.

Date histologice. Preparatele histologice realizate prin ganglionii vegetativi simpatici de la şoareci în vîrstă de 12 zile trataţi cu opt doze de NGF purificat (fig. 6) prezintă diferenţe marcante privind talia neuronilor în raport cu ganglionii similari proveniţi de la şoareci martori,



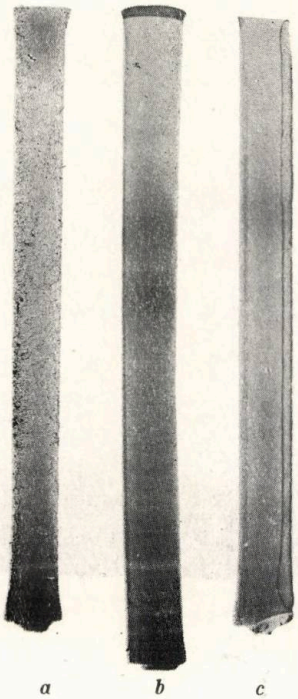
a *b* *c* *d*

Fig. 1. — Disc-electroforeza în gel de poliacrilamidă, tampon glicocol pH 8, $\mu = 0{,}05$, a fracțiunilor obținute la gel-filtrarea pe Sephadex G-100 a supernatantului liofilizat : *a* — piscul I ascendent ; *b* — piscul I descendent ; *c* — piscul II ; *d* — piscul IV.



a *b* *c*

Fig. 2. — Disc-electroforeza în gel de poliacrilamidă, tampon β-alanină pH 4,5, a fracțiunilor obținute pe Sephadex G-100.



a *b* *c*

Fig. 3. — Disc-electroforeza în gel de poliacrilamidă, mediu acid, a piscurilor obținute la cromatografia pe DEAE-celuloză.

Fig. 4. — Fragmente de lanțuri ganglionare simpatice paravertebrale la puii de șoarece în vîrstă de 12 zile, injectați cu opt doze NGF (stînga) și martor (M_1) (dreapta).

Fig. 5. — Lanț ganglionar simpatic paravertebral la puii de șoarece în vîrstă de 12 zile injectați cu opt doze de NGF (dreapta) și martor (M_1) (stînga).

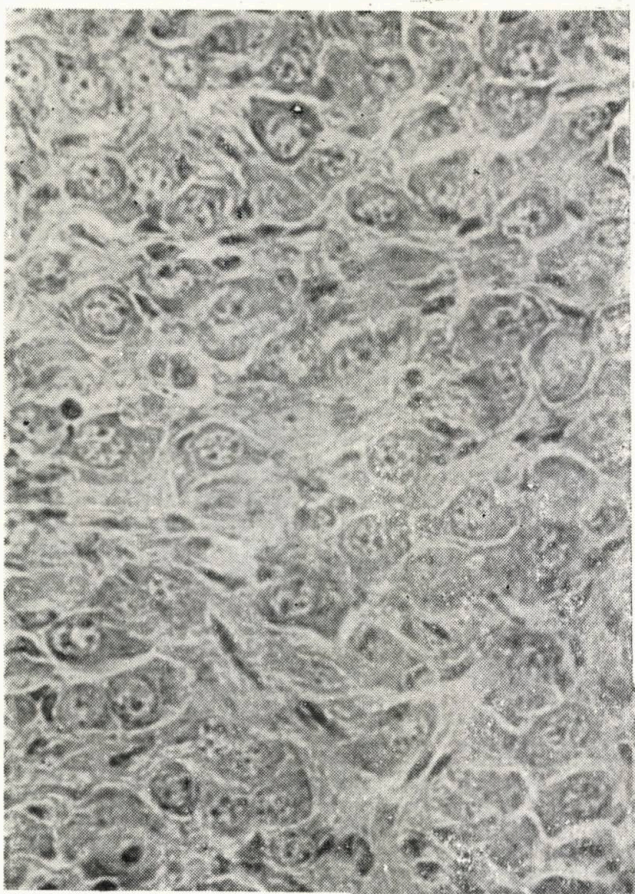


Fig. 6. — Secţiune histologică prin ganglioni simpatici stelaţi la doi şoareci martor, la 12 zile după naştere. Se remarcă neuroni cu aspect normal şi celule gliale. Colorare hemalaun-eozină (640 ×).

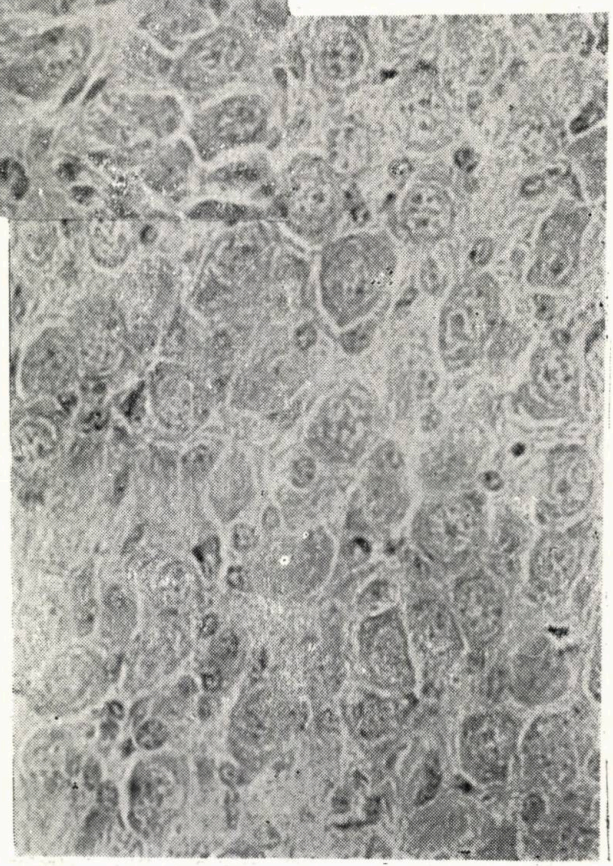


Fig. 7. — Secţiune histologică prin ganglion vegetativ simpatic de şoarece în vîrstă de 12 zile, tratat cu opt injecţii subcutan de extract purificat de glandă salivară de şoarece. Pericarionii sînt hipertrofiaţi, nucleii sînt măriţi şi prezintă mai mulţi nucleoli sau corpi nucleari. Distanţele dintre neuroni sînt mărite şi se observă o uşoară hipertrofie a celulelor gliale. Colorare hemalaun-eozină (640 ×).

neinjectați, în vîrstă de 12 zile (fig. 7). Nucleii sînt mai mari și mai voluminoși. În nuclei se observă numeroși nucleoli și corpi nucleari. Stratul de citoplasmă este mai voluminos în neuronii simpatici ai animalelor tratate.

Tabela 1

Dimensiunile medii (mm) ale ganglionului stelat (S) și ale unor ganglioni toracali (T_1, T_2, T_3) la puii de șoareci de 12 zile tratați cu 8 doze de NGF în raport cu cele de la martori de aceeași vîrstă

Ganglionul		Șoareci tratați cu 8 doze NGF	Martor
S	lung. (mm)	2,15	1,8
	gros. (mm)	0,90	0,5
T_1	lung. (mm)	0,70	0,3
	gros. (mm)	0,40	0,4
T_2	lung. (mm)	0,70	0,3
	gros. (mm)	0,45	0,4
T_3	lung. (mm)	0,60	0,3
	gros. (mm)	0,45	0,3

Nu s-au observat diviziuni ale neuronilor și nici ale celulelor gliale. Numărul celulelor gliale din ganglionii simpatici ai animalelor tratate nu pare să fie superior celui de la animalelor de control; celulele gliale la animalele tratate prezintă o ușoară hipertrofie. Observațiile descrise aici confirmă prezența și activitatea biologică corespunzătoare a factorului de creștere a nervului în preparatele purificate din glanda submaxilară de șoarece mascul adult.

Activitatea protezică a NGF

Activitatea enzimatică a 7 S-NGF pe substrat sintetic. Determinînd în paralel activitatea enzimatică specifică a 7 S-NGF, a subunităților γ și a tripsinei pe substrate sintetice, Greene și colab. (13) au găsit, atît pentru 7 S-NGF cît și pentru γ, activitatea cea mai mare pe BAEE.

Activitatea specifică a 7 S-NGF este în acest caz comparabilă cu cea a tripsinei. Cea mai mică activitate specifică a fost manifestată atît de 7 S-NGF, cît și de componenta γ asupra substratelor BANA și BAA. Un alt substrat foarte puțin specific este și L-Lys-ethyl-ester. De altfel, Orenstein și colab. (26), testînd activitatea enzimatică a HMW-NGF, au demonstrat o activitate crescută pe substratele cu arginină față de cele cu lizină. Activitatea NGF pe BAPA este de asemenea scăzută, dar mai mare decît în cazul substratelor amintite, în timp ce la subunitățile γ se constată o activitate comparabilă cu a tripsinei.

BAEE a fost folosit ca substrat pentru caracterizarea activității esterazice a NGF în majoritatea lucrărilor (13), (27).

TAME a fost utilizat de Young (17) pentru demonstrarea activării autocatalitice a formei stabile HMW-NGF.

În lucrarea de față s-a ales ca substrat TAME pentru a compara atît acțiunea enzimatică a două forme de NGF diferite, HMW- și 7 S-NGF, asupra aceluiași tip de substrat, cît și comportarea 7 S-NGF față de două substrate diferite, TAME și BAEE.

Figura 8 ilustrează modificarea activităţii esterazice a NGF în timp, în funcţie de pH-ul tamponului de incubare. Pentru eliminarea fazei lag, prezentă în activitatea enzimatică a 7 S-NGF la concentraţii mari (folosind ca substrat BAEE) (13), în lucrarea de faţă s-a lucrat pe soluţii de NGF de 0,2 mg/ml diluate cu tampoanele respective (fig. 8)

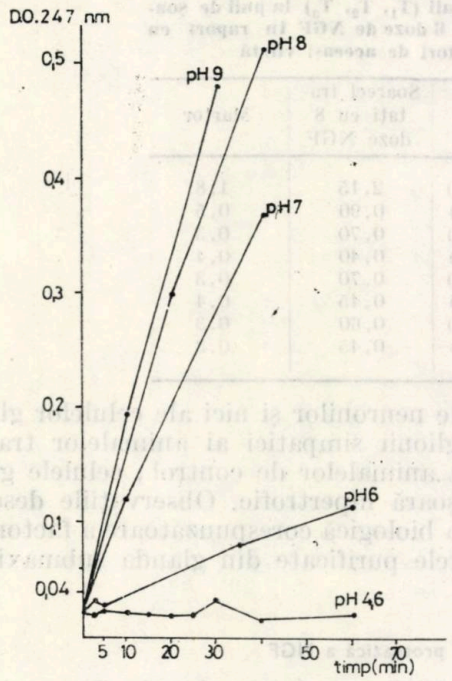


Fig. 8. — Variaţia activităţii NGF cu pH-ul (4 μg NGF în 2 ml tampon conţinînd 20 μl TAME 0,1 M incubate la 25°C). Tampoanele folosite: Tris-HCl 0,1 M, pH 7, pH 8 şi pH 9; tampon fosfat 0,1 M, pH 6 şi tampon acetat pH 4,6. Extincţia pe abscisă reprezintă diferenţa dintre extincţia probei şi cea a martorului fără enzimă.

pînă la 2 μg/ml. După cum se vede în figură, reacţiile sînt liniare, nici una din curbe nu exprimă existenţa fazei lag. O explicaţie a acestui fenomen poate fi disocierea, odată cu diluţia, a complexului 7 S-NGF în componentele sale, cu eliberarea componentei γ, enzimatic activă. Young (17) respinge această explicaţie pentru activitatea formei HMW-NGF asupra substratului TAME. El consideră că diluarea enzimei creşte activitatea enzimatică a acesteia prin eliberarea din complex a ionului de Zn, inhibitor al activării autocatalitice a enzimei. Young a demonstrat că, deşi EDTA nu este absolut necesar reacţiei de autoactivare, aceasta avînd loc prin simpla diluare a enzimei, EDTA creşte rata reacţiei de autoactivare. Concluzii asemănătoare relatează şi Pattison şi Dunn (28).

Explicaţia lui Young pare perfect valabilă în cazul HMW-NGF; pentru 7 S-NGF însă, ambele explicaţii pot fi reale.

Experienţele noastre arată clar o creştere a activităţii enzimatice a 7 S-NGF odată cu creşterea valorilor de pH pe intervalul studiat (4,6—9) (fig. 8).

Activitatea specifică a 7 S-NGF, calculată din valorile de extincţie şi coeficientul de absorbţie molară (540 la 247 nm) şi exprimată în μmoli/min/mg, a fost: 74 pentru pH 6, 222 pentru pH 7, 274 pentru pH 8 şi

344 pentru pH 9. La pH 4,6, activitatea enzimatică este scăzută, prezentînd o ușoară creștere între 25 și 40 min. Interpretarea acestor rezultate în funcție de echilibrul de disociere a 7 S-NGF în subunitățile α, β și γ ar fi că, la valori de pH în jur de 9, la concentrația utilizată în lucrare, cea mai mare parte din componente se află sub formă de subunități libere. Aceasta a fost confirmată de experiențe de sedimentare în gradient de zaharoză (12), care au arătat prezența activității esterazice la pH 6,75 exclusiv în regiunea subunităților 2, 5 S, în timp ce la pH 7, numai în regiunea 7 S.

Activitatea enzimatică a 7 S-NGF pe substrat proteic. Testate pe cazeină, piscurile proteice conținînd NGF au prezentat activitate proteazică (fig. 9); se observă o activitate mai puțin intensă la piscul I DEAE și absența ei la piscul III DEAE. În timpul purificării, activitatea enzimatică a scăzut (pisc I d Sephadex, respectiv pisc II DEAE), în timp ce activitatea biologică, așa cum s-a arătat anterior, a crescut. Greene și colab. (27) au găsit de asemenea o activitate proteazică a NGF folosind ca substrat cazeina, activitate ce reprezintă mai puțin de 1% din activitatea tripsinei testate în aceleași condiții. Orenstein și colab. (26), incubînd HMW-NGF cu azocazeină 4,5 ore la 25°C, nu au sesizat nici o activitate proteazică, ceea ce se poate datora fie condițiilor de incubare, fie stabilității crescute a HMW comparativ cu a 7 S-NGF, componenta activă fiind legată în complex.

Dacă activitatea enzimatică a γ-NGF este recunoscută de majoritatea lucrărilor din literatură, rolul ei nu este încă lămurit. În complexul 7 S-NGF, subunitatea γ, la fel de probabil ca și α, ar putea participa la

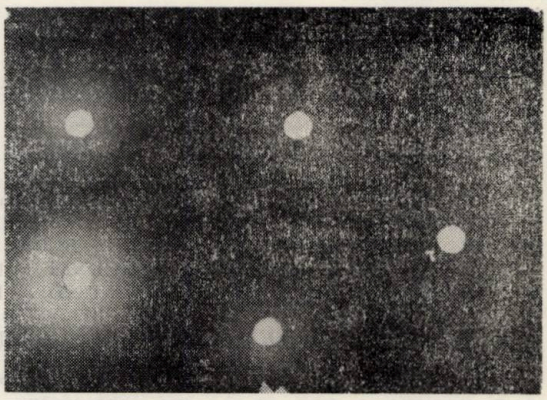


Fig. 9. — Difuzia radială (24 ore, 37°C) a piscurilor proteice obținute la separarea și purificarea NGF, diferite experimente, la pH 9. În godeuri de la stînga la dreapta: pisc II DEAE-celuloză, experiment 8; pisc II DEAE-celuloză, experiment 6; pisc I d Sephadex, experiment 4; pisc I DEAE-celuloză, experiment 8; pisc III DEAE-celuloză, experiment 8.

protecția față de proteoliză a componentei β. Această explicație este susținută de date care arată că NGF preparat prin disocierea complexului 7 S-NGF are scindat octapeptidul HN_2-terminal în proporție de 10%, în timp ce β-NGF, preparat direct din omogenatul de glandă submaxilară, în proporție de 50% (29).

Importanța fiziologică a acestei activități enzimatice nu s-a demonstrat. Recent s-a subliniat rolul proteazelor ca factori de creștere (30), demonstrîndu-se că numeroase proteaze pot stimula proliferarea celulelor animale în culturi. Trombina este una din proteazele la care s-a studiat

mecanismul de producere a diviziunii celulare. Astfel de date vor putea probabil lămuri şi rolul fiziologic al activităţii enzimatice a NGF, motivînd existenţa a două funcţii contradictorii : degradare şi sinteză în cadrul aceleiaşi molecule proteice.

Prezentat la redacţie
la 6 decembrie 1982

Institutul de ştiinţe biologice,
Laboratorul de imunochimie,
Bucureşti, Splaiul Independenţei nr. 296

NERVE GROWTH FACTOR. BIOLOGICAL AND ENZYMIC PROPERTIES

SUMMARY

The nerve growth factor was isolated from the mouse submaxillary gland and purified by Sephadex G-100 gel-filtration and DEAE-cellulose chromatography. The fractions obtained during various steps of preparation were characterized by alkaline and acid PAA gel electrophoresis. NGF biological activity was tested *in vivo*. The increase in the magnitude of sympathetic nervous ganglia, in the nuclei volume, in the nucleoli number as well as in the width of the cytoplasma layer was detected by microanatomical and histological methods. The esterase activity of NGF, demonstrated by using TAME as substrate, increased from pH 6 to pH 9. Proteolytic activity of NGF was noticed on casein at pH 9 by radial diffusion.

BIBLIOGRAFIE

1. W. C. MOBLEY, A. C. SERVER, D. N. ISHII, R. J. RIOPELLE, E. M. SHOOTER, New Engl. J. Med., **297**, 1096, 1149 (1977).
2. G. P. HARPER, H. THOENEN, J. Neurochem., **34**, 5 (1980).
3. P. WALKER, M. E. WEICHSEL, D. A. FISCHER, Life Sciences, **26**, 195 (1980).
4. J. R. PEREZ-POLO, C. E. BECK, M. BLUM, *Perspectives in Schizophrenia Research*, sub red. C. BAXTER, I. MELNECHUR, Raven Press, New York, 1980.
5. J. R. PEREZ-POLO, P. DY, K. WESTLUND, K. HALL, K. LIVINGSTON, Birth Defects, Original Article Serves, **14**, 311 (1978).
6. R. A. MURPHY, J. D. SAIDE, M. H. BLANCHARD, M. YOUNG, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **74**, 2330 (1977).
7. R. LEVI MONTALCINI, P. V. ANGELETTI, Phys. Rev., **48**, 534 (1968).
8. S. COHEN, J. Biol. Chem., **234**, 1129 (1959).
9. G. P. HARPER, Y. A. BARDE, G. BURNSTOCK, J. R. CARSTAIRS, M. E. DENNISON, K. SUDA, C. A. VERNON, Nature, **279**, 160 (1979).
10. M. YOUNG, J. D. SAIDE, R. A. MURPHY, M. H. BLANCHARD, Biochemistry, **17**, 1490 (1978).
11. S. VARON, J. NOMURA, E. M. SHOOTER, Biochemistry, **7**, 1296 (1968).
12. S. VARON, J. NOMURA, E. M. SHOOTER, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **57**, 1782 (1967).
13. L. A. GREENE, E. M. SHOOTER, S. VARON, Biochemistry, **8**, 3735 (1969).
14. R. W. STACH, P. F. PIGNATI, M. E. BARKER, E. M. SHOOTER, J. Neurochem., **34**, 850 (1980).
15. B. J. DAVIS, Ann. N.Y. Acad. Sci.,**121**, 404 (1964).
16. R. A. REISFELD, U. J. LEWIS, D. E. WILLIAMS, Nature, **195**, 281 (1962).
17. M. YOUNG, Biochemistry, **18**, 3050 (1979).

18. W. B. SCHILL, G.F.B. SCHUMACHER, Analit. Biochem., **46**, 502 (1972).
19. V. BOCCHINI, P. U.ANGELETTI, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **64**, 787 (1969).
20. A. P. SMITH, S. VARON, E. M. SHOOTER, Biochemistry, **7**, 3529 (1968).
21. K. SUDA, Y. A. BARDE, H. THOENEN, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **75**, 4042 (1978).
22. K. HAYASHI, S. FURUKAWA, T. OHI, H. YMURA, *Growth and Growth Factors*, sub red. K. SHIZUME, K. TAKANO, 1980, Univ. of Tokyo Press, 1980, p. 253.
23. E. D. BUEKER, I. SCHENKEIN, Ann. N.Y. Acad. Sci., **118**, 147 (1964).
24. D. C. EDWARDS, E. L. PENTON, S. KASKARI, B. J. LARGE, L. PAPADARY, E. ZAIMOS, J. Physiol., **186**, 10 (1966).
25. I. A. HENDRY, J. Neurocytol., **6**, 299 (1977).
26. N. S. ORENSTEIN, H. A. DVORAK, M. H. BLANCHARD, M. YOUNG, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **75**, 5497 (1978).
27. L. A. GREENE, E. M. SHOOTER, S. VARON, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **60**, 1383 (1968).
28. S. E. PATTISON, N. F. DUNN, Biochemistry, **14**, 2733 (1975).
29. W. H. WILSON, E. M. SHOOTER, J. Biol. Chem., **254**, 6002 (1979).
30. D. D. CUNNINGHAM, in *Tissue Growth Factors*, sub red. R. BASERGA, Springer Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1981, p. 242.

CARACTERIZAREA CATALITICĂ A UNEI LIPAZE FUNGICE ÎN STARE LIBERĂ ŞI IMOBILIZATĂ PE ALCOOL POLIVINILIC RETICULAT

OFELIA GOZIA, HORST D. SCHELL, VIORICA LAZĂR, OLGA MOLDOVAN

Rezumat. Studiul comparativ al lipazei (din *A. oryzae*) în stare liberă şi imobilizată pe alcool polivinilic reticulat şi activat cu BrCN a demonstrat că prin imobilizare enzima devine mai rezistentă la variaţiile de pH şi temperaturi ridicate şi mai stabilă faţă de acţiunea inhibitoare a unor ioni metalici.

În ultimii ani se acordă o importanţă tot mai mare enzimelor imobilizate obţinute prin fixare pe suporturi macromoleculare insolubile datorită multiplelor posibilităţi de aplicare în cercetarea ştiinţifică fundamentală şi în diferite ramuri ale practicii.

Printre suporturile recent realizate, aplicabile şi la imobilizări de enzime, se numără şi alcoolul polivinilic, care posedă proprietăţi mecanice foarte bune, mai ales în stare reticulată, şi prezintă adsorbţii nespecifice reduse (1). De menţionat este şi faptul că produsul este realizat în ţară prin tehnologii originale.

În lucrarea de faţă descriem obţinerea şi proprietăţile unui preparat enzimatic insolubilizat, realizat prin legarea covalentă a lipazei de alcool polivinilic reticulat, de tipul PVA X-20, activat cu BrCN.

Lipaza (EC 3.1.1.3) face parte din grupa esterazelor şi catalizează hidroliza esterilor emulsionaţi ai glicerolului sau a altor alcooli, precum şi acizii graşi cu lanţuri lungi. Substratul nu este o singură moleculă, ci o fază neapoasă de agregate lipidice. Substratele caracteristice şi în acelaşi timp operative sînt reprezentate de agregate formate din molecule de esteri, micele sau filme monomoleculare la interfaţa unui mediu apos. Activitatea enzimatică este direct legată de concentraţia moleculelor substratului la interfaţă, iar viteza iniţială de reacţie este în funcţie de numărul de molecule de enzimă adsorbite la această interfaţă (2), (3), (4), (5).

MATERIAL ŞI METODE

Experienţele au fost efectuate pe lipază obţinută din fungi. A fost aleasă o tulpină de *A. oryzae*, care a fost cultivată pe un mediu format din făină de soia, amidon solubil, fosfat dipotasic, sulfat de amoniu, sulfat de magneziu, carbonat de calciu şi ulei de măsline, cu agitare, la pH 7,0 (6).

Purificarea lipazei din *A. oryzae* s-a făcut după metoda lui Fukumoto şi colab. (7) cu unele modificări aduse de noi. Mediul de cultură a fost centrifugat şi supernatantul tratat cu sulfat de amoniu între 40 şi 70% saturaţie. Precipitatul dizolvat în apă şi dializat faţă de un tampon acid acetic-acetat 0,01 M, pH 5,0, a fost cromatografiat pe o coloană de DEAE-PVA, folosind pentru eluţie un gradient discontinuu de NaCl de 0,2 M. Fracţiunile cu activitate enzimatică maximă, colectate şi concentrate la un sfert din volumul iniţial, au fost tratate cu

acetonă. Precipitatul obținut între 35 și 60% concentrație finală de acetonă a fost dizolvat în tampon citrat 0,066 M, pH 5,6, și reprezintă enzima purificată.

Activitatea enzimatică a fost determinată după metoda lui Ota și Yamada (8), modificată de Selokova (9). Mediul de reacție a fost compus din tampon fosfat-citrat 0,066 M, pH 5,6, substrat reprezentînd o emulsie de ulei de măsline în alcool polivinilic 1% și lichid de cultură diluat cu tampon corespunzător activității enzimatice. Amestecul de reacție a fost incubat o oră la 25°C, cu agitare continuă. După stoparea reacției cu etanol, amestecul a fost titrat cu KOH 0,05 N în prezență de fenolftaleină. La fiecare probă s-a efectuat un martor în aceleași condiții, cu diferența că lichidul de cultură se adaugă după stoparea reacției cu etanol. O unitate de activitate enzimatică reprezintă cantitatea de enzimă care eliberează 1 μmol de acid oleic din emulsie într-o oră la 25°C și la pH 5,6. Activitatea enzimatică s-a exprimat în μmoli acid oleic format/oră/mg proteină la 25°C, pH 5,6.

Cantitatea de proteină a fost determinată după metoda Lowry, modificată de Miller (10).

Imobilizarea lipazei pe PVA X-20. Gelul perlat de alcool polivinilic reticulat a fost întîi activat cu BrCN, după care s-a trecut la cuplarea enzimei, adăugînd peste 30 ml gel activat 20 ml extract enzimatic cu un conținut proteic de 0,69 mg proteină/ml. Amestecul de reacție a fost păstrat pînă a doua zi la 4°C, după care conjugatul enzimatic rezultat s-a spălat de mai multe ori cu apă distilată și cu o soluție de NaCl 0,5 M, pînă la îndepărtarea completă a enzimei nelegate.

Determinarea cantității de enzimă legată de suport s-a efectuat prin dozarea azotului într-o cantitate cunoscută de gel enzimatic cu ajutorul micrometodei Parnas, scăzînd din valoarea obținută cea a suportului fără enzimă, determinată în prealabil.

Activitatea enzimatică a conjugatului imobilizat a fost determinată după aceeași metodă ca și în cazul enzimei libere, utilizînd cîte 0,25 ml gel depus, suspendat în tamponul de lucru.

Efectul pH-ului s-a studiat urmărind reacția în tampon fosfat-citrat 0,066 M la diferite valori de pH: 2,9; 4,2; 5,6; 6,2; 7,0 și 8,0.

Efectul temperaturii asupra activității enzimatice s-a urmărit incubînd mediul de reacție (pH 5,6, timp de 60 min) la următoarele temperaturi: 25, 35, 45 și 55°C.

Efectul ionilor metalici asupra activității enzimatice s-a studiat urmărind reacția enzimatică în prezența ionilor de Cu^{2+} și Fe^{2+} sub formă de sulfați. Concentrațiile în mediul de reacție ale celor doi ioni au fost cuprinse între 0,1 și 1 mM pentru Fe^{2+} și între 1 și 10 mM pentru Cu^{2+}.

Efectul unor reactivi specifici grupărilor tiol asupra activității enzimatice s-a studiat urmărind reacția în prezența $HgCl_2$ și p-cloromercuribenzoat; concentrațiile în mediul de reacție ale celor doi reactivi au fost cuprinse între 0,1 și 1 mM.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Atenția noastră s-a oprit asupra unei tulpini de *A. oryzae* care prin cultivare a furnizat un lichid de cultură cu activitate lipazică maximă la 48 de ore. Totodată, această tulpină, spre deosebire de celelalte testate, a furnizat date reproductibile, fapt ce ne-a determinat să o folosim în scopul izolării și purificării lipazei.

În urma purificării s-a obținut un preparat enzimatic cu o activitate de 1383,76 μmoli acid oleic/oră/mg proteină și cu un factor de purificare de 52. Prin legarea covalentă a lipazei din *A. oryzae* de PVA X-20, activat cu BrCN, s-a obținut un preparat enzimatic insolubil cu o activitate reziduală de 29,8%.

Menționăm că lipaza a mai fost imobilizată prin microîncapsulare de către Kitajima și colab. în 1969 (11), prin legare covalentă de poliacrilamidă de Liberman și Ollis în 1975 (12) și de globulină în 1979 (13).

Unul din aspectele urmărite de noi în lucrarea de față a fost de a stabili pH-ul optim atît pentru enzima liberă, cît și pentru cea imobilizată. Valorile pH-ului optim indicat în literatură variază în funcție de sursa utilizată pentru izolarea și purificarea lipazei (6), (9), (14).

În ceea ce priveşte enzimele imobilizate, reprezentările grafice ale activităţii în funcţie de pH pot releva modificări ale pH-ului optim şi ale formei generale a curbei în comparaţie cu enzimele libere. Astfel, forma curbei poate prezenta o deschidere mai mare, mai mică, asimetrică sau identică cu cea a enzimei libere (15), (16), (17), (18). Totodată, sarcina

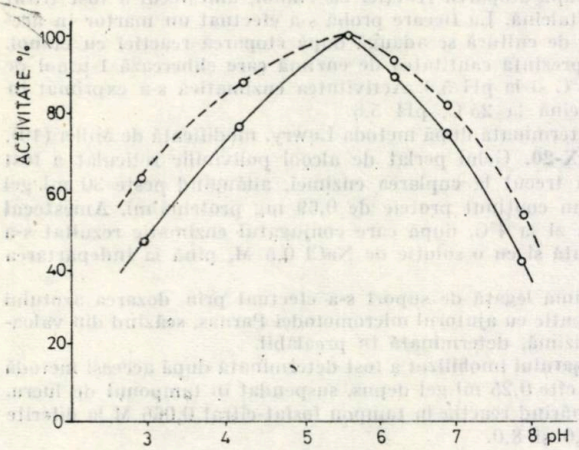


Fig. 1. — Efectul pH-ului asupra activităţii enzimatice a lipazei libere (———) şi imobilizate (— — —).

electrică a suportului poate influenţa comportarea enzimei imobilizate datorită creării unui micromediu în jurul conjugatului enzimatic insolubil în apă. Acest efect de sarcină a fost discutat pe larg în cazul enzimelor imobilizate prin legare covalentă de către Goldestein şi colab. (19).

După cum se poate vedea din figura 1, ambele preparate enzimatice prezintă în cazul nostru acelaşi pH optim, situat la valoarea de 5,6. Se constată totuşi că deschiderea curbei descrise de enzima imobilizată este mult mai mare comparativ cu cea liberă, ceea ce denotă că enzima imobilizată este mai rezistentă faţă de variaţiile de pH comparativ cu cea liberă. Astfel, dacă la pH 2,9 enzima liberă îşi mai păstrează 47% din activitatea maximă, enzima imobilizată mai prezintă încă 63% din activitatea ei maximă la pH optim. Situaţia se repetă şi la valorile de pH aflate deasupra pH-ului optim: 6,2, 7,0 şi, respectiv, 8,0.

Deoarece timpul de reacţie este relativ mare, s-a preferat în cazul ambelor preparate enzimatice studierea efectului temperaturii asupra activităţii enzimatice prin urmărirea reacţiei la diferite temperaturi, în locul determinării stabilităţii termice prin preincubare (fig. 2).

Şi în acest caz enzima imobilizată se dovedeşte a fi mai rezistentă faţă de variaţiile de temperatură, comparativ cu enzima liberă. Remarcăm în cazul ambelor preparate enzimatice o creştere a activităţii pe măsura creşterii temperaturii pînă la atingerea unei valori maxime, după care aceasta începe să scadă. Rezistenţa deosebită a enzimei imobilizate faţă de variaţiile de temperatură este ilustrată semnificativ de valorile temperaturilor optime pentru cele două enzime: 35°C pentru enzima liberă şi 45°C pentru enzima imobilizată. Se observă că, în timp ce la 45°C enzima imobilizată prezintă activitate maximă, enzima liberă mai păstrează în aceste condiţii doar 60% din activitatea ei maximă prezentată la 35°C. Situaţia se repetă şi la temperatura de 55°C, cînd enzima liberă mai păs-

trează 12% din activitatea maximă, în timp ce enzimei imobilizate îi revin 60% din activitatea maximă. Deoarece nu s-a constatat existenţa unei diferenţe mari între activităţile enzimatice la 25°C şi la temperaturile

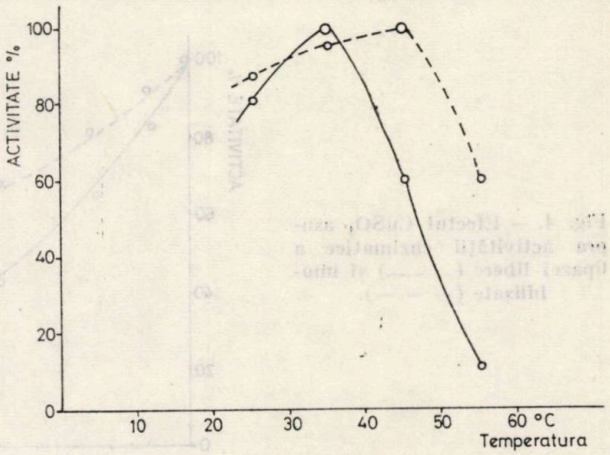


Fig. 2. — Efectul temperaturii asupra activităţii lipazei libere (———) şi imobilizate (— — —).

optime, s-a preferat urmărirea reacţiei enzimatice în cazul studierii celorlalte proprietăţi catalitice la temperatura de 25°C.

Deoarece este bine cunoscut efectul inhibitor al ionilor metalici asupra activităţii enzimelor, am urmărit în cadrul lucrării de faţă şi efectul Fe^{2+} şi Cu^{2+} sub formă de sulfaţi asupra activităţii ambelor preparate

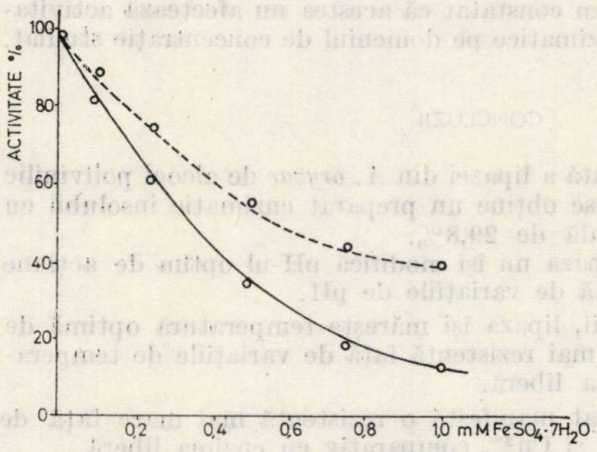


Fig. 3. — Efectul $FeSO_4$ asupra activităţii enzimatice a lipazei libere (———) şi imobilizate (— — —).

enzimatice de lipază. Se poate constata (fig. 3) că efectul inhibitor al Fe^{2+} este mult mai puternic decît al Cu^{2+} (fig. 4). În ceea ce priveşte comportarea celor două preparate enzimatice, se poate remarca şi în acest caz o rezistenţă mai mare a enzimei imobilizate faţă de efectul inhibitor al celor doi ioni. Astfel, în timp ce la concentraţia maximă de 1 mM $FeSO_4$ în mediul de reacţie enzima liberă mai prezintă 12% din activitatea maximă, enzima imobilizată mai păstrează 39% din activitatea prezentată în

absenţa inhibitorului. Acelaşi lucru se poate remarca şi în cazul $CuSO_4$ la concentraţia de 10 mM în mediul de reacţie, cînd enzima imobilizată mai păstrează 58% din activitatea maximă, în timp ce enzimei libere îi revin numai 24%. Efectul inhibitor al celor doi ioni s-ar putea explica

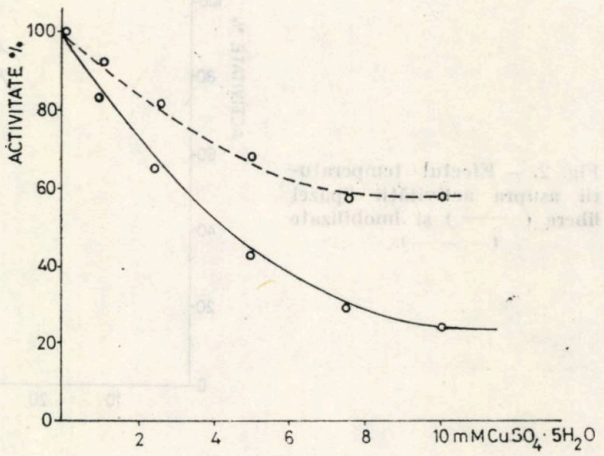


Fig. 4. — Efectul $CuSO_4$ asupra activităţii enzimatice a lipazei libere (———) şi imobilizate (— — —).

prin afinitatea pe care aceştia o au faţă de o serie de resturi de aminoacizi (histidină, treonină, glutamină), determinînd modificarea conformaţiei active a enzimei.

S-a urmărit de asemenea şi efectul unor substanţe specifice grupărilor tiol pentru a vedea dacă lipaza este o tiolenzimă, ca, de pildă, $HgCl_2$ şi p-cloromercuribenzoat. Am constatat că acestea nu afectează activitatea celor două preparate enzimatice pe domeniul de concentraţie studiat.

CONCLUZII

1. Prin legarea covalentă a lipazei din *A. oryzae* de alcool polivinilic reticulat activat cu BrCN, se obţine un preparat enzimatic insolubil cu activitate catalitică reziduală de 29,8%.

2. Prin imobilizare, lipaza nu îşi modifică pH-ul optim de acţiune şi devine mai rezistentă faţă de variaţiile de pH.

3. În urma imobilizării, lipaza îşi măreşte temperatura optimă de acţiune, devenind totodată mai rezistentă faţă de variaţiile de temperatură, comparativ cu enzima liberă.

4. Preparatul imobilizat manifestă o rezistenţă mai mare faţă de acţiunea inhibitoare a Fe^{2+} şi Cu^{2+}, comparativ cu enzima liberă.

5. Reactivii specifici grupărilor tiol, de tipul $HgCl_2$ şi p-cloromercuribenzoat, nu afectează activitatea celor două preparate enzimatice pe domeniul de concentraţie 0,1—1 mM.

6. Prin folosiri repetate, preparatul îşi pierde parţial activitatea.

Prezentat la redacţie
la 6 decembrie 1982

Institutul de ştiinţe biologice
Bucureşti, Splaiul Independenţei nr. 296

KATALYTISCHE EIGENSCHAFTEN EINER LIPASE AUS PILZEN IN FREIEM UND IN AN POLYVINYLALKOHOL IMMOBILISIERTEM ZUSTAND

ZUSAMMENFASSUNG

Die vergleichende Untersuchung der nativen und der an BrCN-aktivierten Polyvinylalkohol fixierten Lipase aus *A. oryzae* zeigte, daß die Stabilität des Enzyms durch die Trägerfixierung gegenüber Schwankungen des pH-Wertes, erhöhten Temperaturen und der hemmenden Wirkung von Metallionen ansteigt.

BIBLIOGRAFIE

1. H. D. SCHELL, M. A. MATEESCU, M. DIMONIE, C. OPRESCU, T. BENŢIA, Brevet invenţie nr. 74486/1980, R. S. România.
2. H. BROCKERHOFF, R. G. JENSEN, *Lipolytic Enzymes*, Academic Press, New York, 1974.
3. S. ESPOSITO, M. SEMERIVA, P. DESNUELLE, Biochim. Biophys. Acta, **302**, 293 (1973).
4. J. W. LAGOCKI, J. H. LAW, F. J. KEZDY, J. Biol. Chem., **248**, 580 (1973).
5. G. BENZONANA, P. DESNUELLE, Biochim. Biophys. Acta, **105**, 121 (1965).
6. J. M. VOLKOVA, J. D. LEBEDEVA, Mikrobiologhia, **XLVIII**, 653 (1979).
7. J. FUKUMOTO, M. IWAI, Y. TSUJISAKA, J. Gen. Appl. Microbiol., **10**, 257 (1964).
8. Y. OTA, K. YAMADA, Agric. Biol. Chem., **30**, 35 (1966).
9. M. YTABAK, S. S. SELOKOVA, Mikrobiologhia, **XLVIII**, 657 (1979).
10. G. L. MILLER, Analyt. Chem., **31**, 964 (1959).
11. M. KITAJIMA, S. NIYANO, A. KONDO, J. Chem. Soc., **72**, 493 (1969).
12. R. LIBERMAN, D. F. OLLIS, Biotechnol. Bioeng., **XVII**, 1401 (1975).
13. M. M. RAKHIMOV, N. R. ZEMILYANSKAYA, R. R. AVLYANOVA, I. S. TILYABAEVA, Biohimija, **44**, 1346 (1979).
14. K. AISAKA, O. TERADA, J. Biochem., **89**, 817 (1981).
15. W. F. LINE, A. KWONG, H. H. WEETALL, Biochim. Biophys. Acta, **242**, 194 (1971).
16. G. P. ROYER, G. M. GREEN, Biochem. Biophys. Res. Commun., **44**, 426 (1971).
17. J. C. LEE, Biochim. Biophys. Acta, **235**, 435 (1971).
18. W. H. STIMSON, A. SEREFINI-FRAGASSINI, FEBS Lett., **17**, 318 (1971).
19. L. GOLDESTEIN, Y. LEVIN, E. KATCHALSKI, Biochemistry, **3**, 1913 (1964).

DISTRIBUȚIA ACTIVITĂȚII ARILSULFATAZICE ÎN ORGANELE COROPIȘNIȚEI (*GRYLLOTALPA GRYLLOTALPA*)

DUMITRU I. IGA, IRINA TEODORESCU, ILINCA NICOLAE

Rezumat. S-a studiat distribuția arilsulfatazei în diferite organe ale coropișniței (*Gryllotalpa gryllotalpa*). Patru din cele nouă organe studiate conțin activitatea enzimatică menționată. S-a realizat de asemenea un studiu comparativ al activității arilsulfatazice din glandele genitale anexe și din stomac privind acțiunea unor efectori și variația pH-ului.

Arilsulfataza (EC 3.1.6.1), enzimă care hidrolizează esterii acidului sulfuric, este de trei tipuri: arilsulfataza C, situată în membrană și care pare să fie o steroidsulfatază; arilsulfataza A, care scindează cerebrozidsulfatul; arilsulfataza B, care este o UDP N-acetilgalactozamin-4-sulfatază, ultimele două fiind situate în lizozomi (1). Arilsulfataza are o răspîndire foarte largă, fiind găsită la bacterii, fungi, moluște (2), păsări (3), mamifere (4). Se cunosc puține lucruri despre existența acestei enzime la insecte. A. B. Roy (5) a identificat-o la *Locusta migratoria* și *Schistocerca gregaria*. D. I. Iga (6) a găsit această enzimă la 16 specii de insecte.

În lucrarea de față se prezintă rezultatul investigării arilsulfatazei la coropișniță și se urmăresc proprietățile comparative ale enzimei provenind din glandele genitale anexe și stomac.

MATERIALE ȘI METODE

Substratul, 2-hidroxi-5-nitrofenilsulfat (nitrocatecolsulfat, NCS), a fost sintetizat prin metoda lui A. B. Roy (5) și J. N. Smith (7) și recristalizat de mai multe ori din apă distilată. Pentru studiul enzimei s-au utilizat doi indivizi de sex masculin ale căror organe au fost prelucrate separat, rezultatul prezentat fiind media celor două determinări. Imediat după disecția insectelor, țesuturile au fost omogenizate și extrase cu apă distilată timp de o oră la 4°C. Omogenatul a fost centrifugat 15 min la 4 000 rot/min și s-a reținut supernatantul. Activitatea enzimatică a fost determinată în felul următor: 0,5 ml soluție enzimatică s-a amestecat cu 0,5 ml soluție NCS 20 mM în tampon acid acetic-acetat de sodiu 0,5 M, pH 5,5 și s-a incubat o oră și 30 min la 37°C. Reacția a fost stopată adăugînd 1 ml soluție NaOH 0,5 N, după care s-a măsurat extincția la 515 nm. Proteina a fost determinată prin metoda Lowry (8) cu albumină serică bovină ca standard. Activitatea enzimatică a fost calculată cu formula indicată (4). Pentru determinarea pH-ului optim s-a utilizat tampon acetat 0,5 M la diferite pH-uri, care conținea 1,5 mg NCS/ml. Acțiunea efectorilor s-a urmărit astfel: 0,05 ml soluție efector 100 mM în apă distilată (cu excepția taurocolatului, care era 10%) s-a amestecat cu 0,5 ml soluție tampon acetat 0,5 M, pH 5,5 și 0,1 ml soluție enzimatică ce fusese dializată 48 de ore față de tampon tris-HCl 25 mM, pH 7,8. Amestecul a fost menținut 30 min la temperatura camerei, după care s-a adăugat 0,15 ml soluție NCS 20 mM în tamponul acetat de mai sus. Amestecul a fost incubat 2 ore și 30 min la 37°C, după care reacția enzimatică a fost stopată cu un ml soluție de hidroxid de sodiu.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Distribuția activității arilsulfatazice în diferite organe provenind de la coropișniță este prezentată în tabela 1. După cum se observă, activita-

Tabela 1

Distribuția activității arilsulfatazice la coropișniță *(Gryllotalpa gryllotalpa)*

Organul	Activitatea enzimatică nmoli/mg proteină/oră
Glande genitale anexe	1342,5
Proventricul	305,2
Stomac	290,5
Intestin subțire	120
Tubul Malpighi	0
Guşă	0
Rect	0
Țesut adipos	0
Musculatură protoracică	0

tea maximă este în glandele genitale anexe. Activitatea enzimatică din cele patru organe care posedă această enzimă este de același ordin de mărime cu activitatea enzimatică din creier de pui (3) sau testicul de iepure (9). În ceea ce privește absența activității arilsulfatazice din celelalte organe ale acestei insecte, K. S. Dodgson și B. Spencer (2) au arătat insuficiența rezultatelor negative cînd se lucrează cu un singur substrat.

Tabela 2 prezintă acțiunea unor efectori asupra activității arilsulfatazice din glandele genitale anexe și stomacul de coropișniță. După cum se observă, inhibitori comuni pentru activitatea arilsulfatazică sînt Cu^{2+} și hidroxilamina. Activitatea enzimatică din ambele organe este rezistentă la Fe^{3+} și Pb^{2+}. Inhibitori puternici pentru enzima din glandele genitale sînt fluorura, sulfatul, fosfatul, pirofosfatul și taurocolatul, iar pentru enzima din stomac pirofosfatul și hidroxilamina.

Tabela 2

Acțiunea unor efectori asupra arilsulfatazei din glandele genitale anexe și stomacul de coropișniță *(Gryllotalpa gryllotalpa)*

Efectorul	Concentrația finală (mM)	Activitatea enzimatică	
		glande genitale (%)	stomac (%)
$CuCl_2$	6,25	56	31
$FeCl_3$	6,25	95	98
$Pb(CH_3COO)_2$	6,25	100	83
NaCl	6,25	100	97
NaF	6,25	13	72
Na_2SO_4	6,25	38	88
NaH_2PO_4	6,25	13	90
$Na_4P_2O_7$	6,25	10	55
NH_2OH	6,25	38	15
Taurocolat	6,25%	39	82
Ascorbat	6,25	160	150

Pentru un timp de incubare de 3 ore, pH-ul optim pentru enzima din glande genitale anexe este 5,5, iar pentru enzima din stomac 6,0, după cum se poate vedea din figurile 1 şi 2.

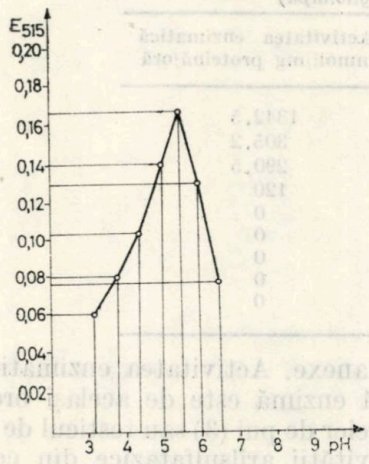


Fig. 1. — Variaţia activităţii arilsulfatazice provenind din glande genitale de coropişniţă cu pH-ul.

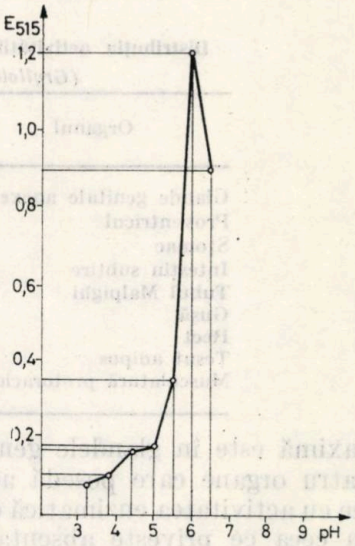


Fig. 2. — pH-ul optim al activităţii arilsulfatazice provenind din stomac de coropişniţă.

Helwig şi colab. (1) au găsit pentru arilsulfataza A din cortex de rinichi de iepure pH-ul optim 5,5, iar pentru arilsulfataza B provenind din aceeaşi sursă 6,0. Farooqui şi Bachhawat (3) şi Farooqui şi Srivastava (9) au constatat că arilsulfataza de tip A este puternic inhibată de fluorură, hidroxilamină, Cu^{2+}.

Ţinînd seama de rezultatele prezentate, precum şi de faptul că în general cele două enzime, A şi B, apar împreună în diferite ţesuturi, se poate presupune că în glandele genitale există predominant enzima de tip A, iar în stomac cea de tip B.

Prezentat la redacţie
la 20 noiembrie 1982

Facultatea de biologie,
Disciplina de biochimie,
Bucureşti, Splaiul Independenţei nr. 91—95

DISTRIBUTION OF ARYLSULPHATASIC ACTIVITY IN SOME ORGANS FROM MOLE CRICKET (*GRYLLOTALPA GRYLLOTALPA*)

SUMMARY

The distribution of arylsulphatasic activity in different organs from mole cricket (*Gryllotalpa gryllotalpa*) was studied. Four from nine organs

studied contained the mentioned activity. It was also realized a comparative study of enzymatic activity regarding some effectors and pH variation.

BIBLIOGRAFIE

1. J.-J. HELWIG, A. A. FAROOQUI, C. BOLLACK, P. MANDEL, Biochem. J., **165**, 127 (1977).
2. K. S. DODGSON, B. SPENCER, in *Methods of Biochemical Analysis*, sub red. D. GLICK, Interscience Publishers Inc., New York, vol. 4, 1962, p. 211.
3. A. A. FAROOQUI, B. K. BACHHAWAT, Biochem. J., **126**, 1025 (1972).
4. D. I. IGA, T. FEREDEAN, MARGARETA HORVATH, ELENA PLEȘCA, Rev. roum. Biochim., **19**, 25 (1982).
5. A. B. ROY, Biochem. J., **68**, 519 (1958).
6. D. I. IGA, Rev. roum. Biol., **35**, 2 (1983).
7. J. N. SMITH, J. Chem. Soc., 2861 (1951).
8. O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, R. J. RANDALL, J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951).
9. A.A. FAROOQUI, P. N. SRIVASTAVA, Biochem, J., **181**, 331 (1979).

INTERACȚIUNEA LIZOZIMULUI UMAN CU UNELE COMPONENTE DIN LAPTE

CORINA MIHAIL

Rezumat. Studiul interacțiunii lizozimului uman (LIZ) cu unele componente din lapte, ca α -lactalbumină (α -lact), IgAS, factor glicoproteic (FGP), lactoferină (LF) și lactoperoxidază (LPO), a fost realizat prin determinarea activității litice a lizozimului cu fiecare componentă în parte, prin metoda difuziei radiale în gel de agar 1 %, în care s-a înglobat substratul specific.
S-a demonstrat efectul sinergic de potențare a activității litice, stabilindu-se raporturi optime între componente : raport de 1 la 10 LIZ-IgAS, raport de 1 la 0,2 LIZ-FGP, raport de 1 la 1,4 LIZ+LF, raport de 1 la 0,1 LIZ-LPO. De menționat inhibarea activității litice la un anumit raport cu α -lactalbumina.
Se discută implicațiile în patologia de mucoase.

Lizozimul este una din substanțele cele mai răspîndite în natură, atît în regnul vegetal, cît și în cel animal și la om, în majoritatea țesuturilor, în umori și la nivelul mucoaselor.

Interesul crescînd pe care îl prezintă lizozimul se datorește acțiunii sale bacteriolitice, pusă în evidență de Fleming (1) la lacrimi.

Jollès (2) a stabilit valorile lizozimului în țesuturi și secreții, după cum urmează : în placentă 5 mg/kg, în salivă 10 mg/kg, în splină 40 mg/kg (exprimate în mg lizozim din albuș de ou, luat ca substanță de referință). Concentrația de lizozim în lacrimi este de 100—150 de ori mai mare decît în ser (3). Laptele și colostrul uman conțin de 3 000 de ori mai mult lizozim decît laptele de vacă, adică aproximativ 40 mg/l (4), lizozim care este mult mai activ decît cel din laptele de vacă (5), fiind și de trei ori mai activ decît cel din albușul de ou (6), (7).

Studii comparative între lizozimul din albușul de ou și cel uman au arătat că acesta din urmă prezintă antigenicități total diferite, un spectru mai larg de acțiune (7), este un factor antibacterian mai eficient și mai selectiv față de microorganismele din flora bucală și are o arie de acțiune mult mai diversificată (8).

Reevaluarea laptelui uman a reactualizat activitatea bactericidă a lizozimului, deoarece el este unul din factorii antibacterieni importanți, compensînd împreună cu ceilalți factori, ca lactoferină, sistem lactoperoxidazic, componenta secretoare, lipide și factori antivirali, lipsa de apărare pînă la instalarea răspunsului imun de mucoase (9).

Studiile efectuate *in vitro* au indicat că aproape nici una din aceste componente nu lucrează ca factor antiinfecțios singură, ci în relații de strînsă dependență cu una sau mai multe componente.

Unul din primii cercetători care au studiat sinergismul de acțiune dintre diferitele componente a fost Wardlaw (10), care a stabilit inter

dependenţa dintre IgAS, lizozim şi complement pentru liza bacteriilor gram-negative. Această acţiune sinergică a fost confirmată ulterior de Adinolfi (11) şi de Hill şi Porter (12). Miller (13) semnalează cuplarea lizozimului cu peroxizi şi acid ascorbic, prezenţi în lapte pentru liza unor salmonele. Se pare că rezultatele experienţelor *in vitro* sînt valabile şi *in vivo*, deoarece administrarea orală a lizozimului singur nu are eficacitate în formarea coproanticorpilor şi a IgAS la copiii colonizaţi artificial cu *E. coli* (14).

Se mai adaugă sinergismul dintre lactoferină şi lizozim la nivelul leucocitelor de iepure, unde se produce o creştere a activităţii litice a acestuia datorită proprietăţii de chelator a lactoferinei (15).

Schaubacha şi Smith (16) demonstrează de asemenea o relaţie de dependenţă între acţiunea bacteriostatică a lactoferinei şi acţiunea litică a lizozimului.

Ne-am propus studierea activităţii litice a lizozimului purificat din lapte uman în prezenţa a diferite alte componente din lapte. Dintre acestea ne-am oprit asupra α-lactalbuminei, IgAS, factorului glicoproteic, lactoferinei şi lactoperoxidazei.

MATERIAL ŞI METODE

Lizozim din albuş de ou de găină NBCo cu 10 000 U/ml. Pentru obţinerea curbei etalon s-au folosit concentraţii variind între 5 mg/ml (50 U/ml) şi 1 000 μg/ml (10 000 U/ml).

Micrococcus lysodeikticus. Cu tulpina NCTC, livrată de Institutul „Dr. I. Cantacuzino" din Bucureşti, s-a realizat o suspensie microbiană care a avut o valoare de 1,6 la 450 nm, citită la fotometrul Spekol.

Mediul de dozare a constat din agar 1% (Difco), NaCl 1% şi tampon fosfat 0,2 M, pH 6,5. În 20 ml din acest mediu s-au introdus 3 ml suspensie microbiană la 56—58°C.

Determinarea activităţii litice a fost realizată prin metoda difuziei radiale în geluri (17), (18), care se bazează pe liza microorganismului test gram-pozitiv *Micrococcus lysodeikticus*. Curba etalon cu lizozim din albuş de ou s-a realizat într-un sistem semilogaritmic, în care pe ordonate s-au pus concentraţiile (în μg/ml sau U/ml), iar pe abscisă valoarea diametrelor zonelor de liză (în mm) după o incubare de 16 ore la 25°C.

Lizozimul din colostru şi lapte uman (LIZ) a fost obţinut prin metoda lui Parry şi colab. (19), **α-lactalbumina** (α-lact) prin metoda lui Forsum (20), IgAS după indicaţiile lui Newcomb (21) şi Mestecky şi colab. (22), **factorul glicoproteic** (FGP) a fost obţinut după C. Motaş (comunicare personală), **lactoferina** (LF) după metoda indicată de Got (23), iar **lactoperoxidaza** (LPO) după metoda lui Pommier şi Cahmann (24).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Studierea acţiunii sinergice a lizozimului cu componentele din lapte, ca α-lactalbumina, IgAS, factorul glicoproteic, lactoferina şi lactoperoxidaza, a fost realizată folosind din fiecare componentă în parte probe în diluţii seriale.

Lizozimul folosit a fost preparatul liofilizat, obţinut de noi, care a avut o activitate litică de 56 μg/ml şi o concentraţie proteică de 260 μg/ml.

Ca probe martor au fost considerate :

— martorul enzimei, notat M_1, care a constat din preparatul de lizozim liofilizat, dizolvat în ser fiziologic sau în tamponul componentei ;

— martorul componentei, notat M_2, care a constat din componenta studiată la toate diluțiile, dizolvată în ser fiziologic sau în tamponul corespunzător.

Pentru toate componentele s-a folosit următoarea schemă de lucru :

1) 0,1 ml lizozim + 0,1 ml ser fiziologic = M_1
2) 0,1 ml lizozim + 0,1 ml componentă la diluția 0 = I
3) 0,1 ml ser fiziologic + 0,1 ml componentă la diluția 0 = M_2
4) 0,1 ml lizozim + 0,1 ml componentă la diluția 1/2 = II
5) 0,1 ml ser fiziologic + 0,1 ml componentă la diluția 1/2 = M_2
6) 0,1 ml lizozim + 0,1 ml componentă la diluția 1/4 = III
7) 0,1 ml ser fiziologic + 0,1 ml componentă la diluția 1/4 = M_2
8) 0,1 ml lizozim + 0,1 ml componentă la diluția 1/8 = IV
9) 0,1 ml ser fiziologic + 0,1 ml componentă la diluția 1/8 = M_2

Deoarece toate probele notate cu M_2 nu au dat activitate litică, ele nu vor fi luate în considerație în nici unul din cazurile studiate. Se vor face referiri numai la probele M_1, I, II, III, IV.

α-Lactalbumină + lizozim

S-a folosit α-lactalbumină în tampon Tris/HCl 0,2 M, pH 7,4, cu o concentrație proteică de 3340 μg/ml.

Lizozimul în tampon Tris a avut o activitate litică de 8,6 μg/ml În toate probele, concentrația proteică a fost de 26 μg.

Rezultatele sînt arătate în figura 1, din care rezultă că, în cazul probelor I și II, care conțin componenta ca atare, nediluată (proba I) și, respectiv, la o diluție a α-lactalbuminei corespunzătoare valorii de 160 μg (proba II), nu se observă practic nici o modificare a activității litice față de M_1. În cazul diluțiilor mai avansate, care corespund la valori de 82 μg, respectiv 41 μg, se constată o inhibare totală, neașteptată, a activității litice.

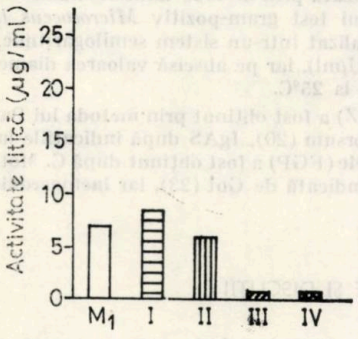


Fig. 1. — Influența acțiunii α-lactalbuminei (α-lact) asupra activității litice a lizozimului (LIZ): M_1 = 0,1 ml LIZ (26 μg) + 0,1 ml tampon Tris, activitate litică = 7 μg/ml; I = 0,1 ml LIZ (26 μg) + 0,1 ml α-lact (330 μg), activitate litică = 8,6 μg/ml; II = 0,1 ml LIZ (26 μg) + 0,1 ml α-lact (160 μg), activitate litică = 6 μg/ml; III = 0,1 ml LIZ (26 μg)+0,1 ml α-lact (82 μg), activitate litică = 0; IV = 0,1 ml LIZ (26 μg)+0,1 ml α-lact (41 μg), activitate litică = 0.

IgAS+ lizozim

S-a întrebuințat IgAS dializată față de ser fiziologic cu o concentrație proteică de 2200 μg/ml.

Lizozimul în ser fiziologic a avut o activitate litică de 56 μg/ml.

Rezultatele sînt date în figura 2, din care, în cazul probei I, se observă o creştere intensă a activităţii litice comparativ cu proba M_1, pentru ca, pe măsură ce diluţiile cresc, să se constate o scădere lină a activităţii litice faţă de cea a componentei nediluate (proba I), scădere care nu este

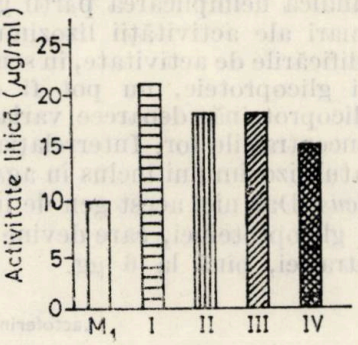


Fig. 2. — Influenţa acţiunii IgAS asupra activităţii litice a lizozimului (LIZ): M_1 = 0,1 ml LIZ (26 µg) + 0,1 ml ser fiziologic, activitate litică = 10 µg/ml; I = 0,1 ml LIZ (26 µg) + 0,1 ml IgAS (220 µg), activitate litică = 21 µg/ml; II = 0,1 ml LIZ (26 µg) + 0,1 ml IgAS (110 µg), activitate litică = 18 µg/ml; III = 0,1 ml LIZ (26 µg) + 0,1 ml IgAS (55 µg), activitate litică = 18 µg/ml; IV = 0,1 ml LIZ (26 µg) + 0,1 ml IgAS (27 µg), activitate litică = 15 µg/ml.

însă proporţională cu concentraţiile din ce în ce mai mici ale IgAS. Aceasta confirmă faptul stabilit şi prin martorul M_2, şi anume că preparatul de IgAS nu conţine lizozim, care ar fi putut să dea creşterea la dublu a probei I.

Reiese că moleculele de IgAS interacţionează cu lizozimul în aşa fel încît dezvăluie centrul activ al acestuia, fenomen ce are loc în limite largi ale concentraţiei IgAS, de la un raport de 1 la 10 între cele două componente (26 µg/220 µg) pînă la un raport de 1 la 1.

Posibilitatea ca acţiunea IgAS să fie nespecifică, datorită creşterii concentraţiei proteice în mediul de reacţie, este infirmată de rezultatele de la folosirea α-lactalbuminei, unde, practic, acelaşi raport proteic de 1 la 8 nu modifică activitatea lizozimului, iar la raportul dintre ele de 1 la 1, activitatea este complet inhibată.

Factor glicoproteic + lizozim

Concentraţia proteică a factorului glicoproteic în ser fiziologic a fost de 530 µg/ml. Lizozimul în ser fiziologic a avut o activitate litică de 56 µg/ml.

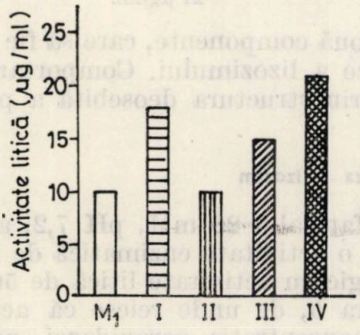


Fig. 3. — Influenţa acţiunii factorului glicoproteic (FGP) asupra activităţii litice a lizozimului (LIZ): M_1 = 0,1 ml LIZ (26 µg) + 0,1 ml ser fiziologic, activitate litică = 10 µg/ml; I = 0,1 ml LIZ (26 µg) + 0,1 ml FGP (53 µg), activitate litică = 18 µg/ml; II = 0,1 ml LIZ (26 µg) + 0,1 ml FGP (26,5 µg), activitate litică = 10 µg/ml; III = 0,1 ml LIZ (26 µg) + 0,1 ml FGP (13 µg), activitate litică = 15 µg/ml; IV = 0,1 ml LIZ (26 µg) + 0,1 ml FGP (6,5 µg), activitate litică = 21 µg/ml.

Rezultatele sînt arătate în figura 3. Am efectuat acest model experimental ştiută fiind marea concentraţie în glucide complexe a acestei

glicoproteine, pentru a putea studia posibila implicare a părții glucidice a IgAS în activarea acțiunii litice a lizozimului.

Din figura 3 reiese că întrebuințarea factorului glicoproteic, obținut prin concentrarea supernatantului de la precipitarea 100% cu sulfat de amoniu, indică neimplicarea părții glucidice, deoarece rezultatele denotă variații mari ale activității lizozimului.

Modificările de activitate, în sensul creșterii ei foarte mari în prezența factorului glicoproteic, nu pot fi explicate prin interacțiunea directă lizozim-glicoproteină, deoarece variațiile nu sînt dependente de raportul dintre concentrațiile lor. Interrelația s-a putut stabili între glicoproteină și substratul lizozimului inclus în agar, modificînd peretele la *Micrococcus lysodeikticus*. Dar nici acest gen de intervenție nu este dependent de concentrația glicoproteinei, care devine totuși mai activă prin scăderea mare a concentrației, pînă la 6 μg.

Lactoferină + lizozim

Lactoferina dializată față de ser fiziologic s-a întrebuințat într-o concentrație proteică de 3000 μg/ml ; lizozim în ser fiziologic cu activitate litică de 56 μg/ml.

Rezultatele sînt date în figura 4, din care se constată o comportare a lactoferinei asemănătoare cu a factorului glicoproteic, în sensul potențării activității lizozimului la diluția cea mai mare. Nu este exclusă o asemă-

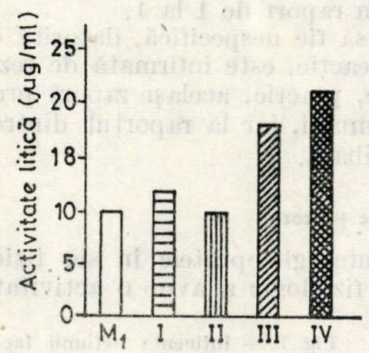


Fig. 4. — Influența acțiunii lactoferinei (LF) asupra activității litice a lizozimului (LIZ) : M_1 = 0,1 ml LIZ (26 μg) + 0,1 ml ser fiziologic, activitate litică = 10 μg/ml ; I = 0,1 ml LIZ (26 μg) + 0,1 ml LF (300 μg), activitate litică = 12 μg/ml ; II = 0,1 ml LIZ (26 μg) + 0,1 ml LF (150 μg), activitate litică = 10 μg/ml ; III = 0,1 ml LIZ (26 μg) + 0,1 ml LF (75 μg), activitate litică = 18 μg/ml ; IV = 0,1 ml LIZ (26 μg) + 0,1 ml LF (37,5 μg), activitate litică = 21 μg/ml.

nare a părții glucidice dintre aceste două componente, care să fie factorul declanșator al măririi activității litice a lizozimului. Comportarea total diferită a IgAS s-ar putea explica prin structura deosebită a părții lor glucidice.

Lactoperoxidaza + lizozim

Lactoperoxidaza în tampon fosfat salin 20 mM, pH 7,2, a avut o concentrație proteică de 112 μg/ml și o activitate enzimatică de 164 μM/min/ml la 25°C ; lizozim în ser fiziologic cu activitate litică de 56 μg/ml.

Rezultatele sînt redate în figura 5, de unde reiese că activitatea litică crește invers proporțional cu concentrația peroxidazei, pentru ca la o diluție foarte mare, de 1,4 μg de enzimă în probă, prezența ei să nu mai poată interveni la nivelul activității litice a lizozimului.

Creşterea puternică a activităţii litice în prezenţa urmelor de lactoperoxidază poate explica raportul normal dintre aceste două componente în laptele uman, demonstrînd rolul important al lizozimului.

Exceptînd α-lactalbumina, pentru toate celelalte patru componente studiate (IgAS, factorul glicoproteic, lactoferina şi lactoperoxidaza) s-au pus în evidenţă raporturile optime dintre lizozim şi fiecare dintre ele,

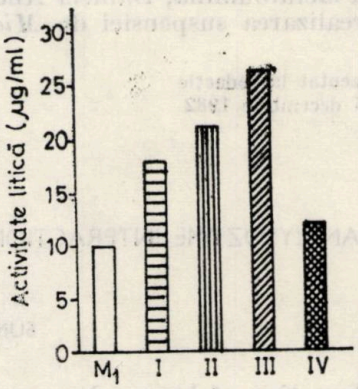


Fig. 5. — Influenţa acţiunii lactoperoxidazei (LPO) asupra activităţii litice a lizozimului (LIZ): M_1 = 0,1 ml LIZ (26 µg) + 0,1 ml ser fiziologic, activitate litică = 10 µg/ml; I = 0,1 ml LIZ (26 µg) + 0,1 ml LPO (11 µg), activitate litică = 18 µg/ml; II = 0,1 ml LIZ (26 µg) +0,1 ml LPO (5,6 µg), activitate litică = 21 µg/ml; III = 0,1 ml LIZ (26 µg) + 0,1 ml LPO (2,8 µg), activitate litică = 26 µg/ml; IV = 0,1 ml LIZ (26 µg) + 0,1 ml LPO (1,4 µg), activitate litică = 12 µg/ml.

care să potenţeze activitatea lizozimului, stabilindu-se următoarele raporturi optime:

1 la 10 pentru lizozim — IgAS;

1 la 0,2 pentru lizozim — factor glicoproteic;

1 la 1,4 pentru lizozim — lactoferină;

1 la 0,1 pentru lizozim — lactoperoxidază.

Cantităţile mici de lactoperoxidază prezente în laptele uman, faţă de cantităţile proporţional mai mari de lizozim, corespund raportului stabilit de noi, sugerînd o acţiune de potenţare reciprocă. Verificarea acestor rezultate se poate realiza printr-o cercetare similară efectuată asupra lactoperoxidazei (Eugenia Pandele, date nepublicate, 1982).

Un alt factor optim de potenţare a lizozimului se dovedeşte a fi şi factorul glicoproteic, şi în cazul lui cantitatea necesară fiind foarte mică.

IgAS şi lactoferina pot creşte de asemenea activitatea lizozimului în raporturi de concentraţii destul de apropiate de cele din laptele uman.

Aşa cum este menţionat în introducere, lizozimul intervine în activitatea IgAS (10), (11), (12), iar din rezultatele noastre reiese interacţiunea lor reciprocă, IgAS potenţînd, la rîndul ei, activitatea lizozimului, mai ales prin prezenţa în cantitate mare în lapte faţă de cantităţile de lizozim.

După cum se ştie, aceleaşi componente din lapte se găsesc în secreţiile de mucoase, formînd sistemul de apărare local.

Rezultatele obţinute, care demonstrează interacţiunea dintre componente, au implicaţii în patologia de mucoase, respiratorie, digestivă, oculară etc., subliniind necesitatea studiului complex al secreţiilor înainte de a se pune un diagnostic de deficienţă. Interreacţia dintre componente

poate compensa o anumită deficiență sau poate declanșa alta, așa cum reiese din datele de inhibiție a α-lactalbuminei.

Mulțumesc pe această cale colegilor de laborator, care mi-au pus la dispoziție componentele necesare studiului sinergismului: Lucia Buzilă pentru IgAS, Eugenia Pandele pentru lactoperoxidază, Florica Chelu pentru α-lactalbumină, Daniela Andrei pentru lactoferină, Elena Enache pentru realizarea suspensiei de *Micrococcus lysodeikticus*.

Prezentat la redacție
la 6 decembrie 1982

Institutul de științe biologice,
Laboratorul de imunochimie,
București, Splaiul Independenței nr. 296

HUMAN LYSOZYME INTERACTION WITH SOME MILK COMPONENTS

SUMMARY

Interaction of human lysozyme (LIZ) with some milk components such as: α-lactalbumin (α-lact), IgAS, glycoproteic factor (GPF), lactoferrin (LF) and lactoperoxidase (LPO) was carried out measuring the lytic activity of lysozyme by the radial diffusion method.

The synergistic effect increasing the lytic activity was proved and optimum ratios of each interaction were established: 1 to 10 for LIZ-IgAS, 1 to 0.2 for LIZ-GPF, 1 to 1.4 for LIZ-LF and 1 to 0.1 for LIZ-LPO. It is worth mentioning the total inhibition of lytic activity noticed at a certain ratio with α-lactalbumin.

The implications of these results in mucous pathology are discussed.

BIBLIOGRAFIE

1. A. FLEMING, Proc. Roy. Soc. Ser. Biol. Sci., **9**, 306 (1922).
2. P. JOLLÈS, J. JOLLÈS, Nature, **192** (4808) 1187 (1961).
3. E. F. OSSERMAN, D. P. LAWLOR, J. Exp. Med., **124**, 921 (1966).
4. R. C. CHANDAN, K. W. SHANANI, R. G. HOLLY, Nature, **204**, 706 (1964).
5. J. K. WELSH, J. T. MAY, J. Pediat., **94**, 1 (1979).
6. P. JOLLÈS, Biochemistry, **6**, 411 (1967).
7. J. R. VAKIL, R. C. CHANDAN, R. M. PARRY, K. M. SHANANI, J. Dairy Sci., **52** 1192 (1969).
8. V. J. IACONO, B. J. MacKAY, S. DIRIENZO, J. J. POLLOCK, Infect. Immunit., **29**, 623 (1980).
9. B. REITER, Ann. Rech. Vet., **9**, 205 (1978).
10. A. C. WARDLAW, J. Exp. Med., **115**, 123 (1962).
11. M. ADINOLFI, A. GLYNN, M. LINDSAY, C. M. MILNE, Immunology, **10**, 517 (1966).
12. I. R. HILL, P. PORTER, Immunology, **26**, 1239 (1971).

13. T. E. MILLER, J. Bacteriol., **98**, 949 (1969).
14. R. LADINOVA, V. JONJA, V. WAGNER, Pediat. Res., **7**, 659 (1973).
15. M. BAGGIOLINI, C. DE DUVE, P. I. MASSON, J. F. HEREMANS, J. Exp. Med., **131**, 559 (1970).
16. I. L. SCHAUBACHA, R. S. SMITH, J. Dairy Sci., **55**, 715 (1971).
17. W. B. SCHILL, G.F.B. SCHUMACHER, Anal. Biochem., **46**, 502 (1972).
18. C. MUŞOLAN, S. VASU, St. cerc. biochim., **20**, 209 (1977).
19. R. M. PARRY Jr., R. C. CHANDAN, K. M. SHANANI, Arch. Biochem. Biophys., **130**, 59 (1969).
20. E. FORSUM, J. Dairy Sci., **59**, 14 (1976).
21. R. W. NEWCOMB, D. NORMANSELL, D. R. STANDWORTH, J. Immunol., **101**, 905 (1968).
22. J. MESTECKY, R. KULHAVY, F. W. KRAUS, J. Immunol., **108**, 738 (1972).
23. R. GOT, Clin. Chim. Acta, **11**, 432 (1965).
24. J. POMMIER, J. CAHMANN, J. Biol. Chem., **254**, 3006 (1979).

CONȚINUTUL PIGMENȚILOR CAROTENOIDICI DIN CÎTEVA PROVENIENȚE HIBRIDE DE PORUMB ȘI DIN LINIILE DIHAPLOIDE DERIVATE DE LA ACESTEA

G. NEAMȚU, C. PANFIL*, C. BOTEZ*, GH. ILLYES, K. L. SIMPSON**

Rezumat. S-au cercetat pigmenții carotenoidici din 12 provenienţe hibride de porumb diploid și din 12 linii dihaploide derivate din provenienţele hibride, pentru a se obține date cu privire la determinismul genetic al biosintezei carotenoidelor în vederea realizării unor forme de porumb noi, cu conținut ridicat de carotenoide provitaminice.

În urma cercetărilor efectuate s-a constatat că la toate liniile dihaploide conținutul total al carotenoidelor provitaminice, care au o valoare biologică superioară celorlalte tipuri de carotenoide, este mai mare decît în materialul inițial de la care au derivat.

Prin mecanismul de derivare a liniilor dihaploide crește conținutul carotenoidelor totale și al celor provitaminice, existînd posibilitatea obținerii unor linii și apoi a unor hibrizi de porumb noi, cu un conținut ridicat de carotenoide, comparativ cu materialul de origine de la care provin.

În numeroase țări se efectuează în prezent cercetări complexe pentru crearea unor soiuri și hibrizi de porumb noi, cu potențial de producție ridicat, rezistenți la boli și dăunători, bine adaptați la condițiile de climă și sol, cu conținut ridicat de substanțe biologic active (1), (2), (3). Efectuarea acestor cercetări se impune cu atît mai mult cu cît porumbul este o plantă de cultură principală, care are un rol însemnat în alimentația oamenilor și în furajarea animalelor, constituind totodată o materie primă de bază pentru industria alimentară.

Dintre substanțele biologic active existente în boabele de porumb, pigmenții carotenoidici au un rol important deoarece ei determină culoarea boabelor, iar carotenoidele provitaminice reprezintă principala sursă din care omul și animalele își sintetizează vitamina A. Prin intermediul acestei vitamine, carotenoidele provitaminice influențează creșterea organismelor animale, refacerea țesuturilor epiteliale, iau parte efectivă la formarea pigmenților fotosensibili implicați în procesul vederii, reduc sterilitatea la animale, protejează numeroase substanțe biologic active de degradări oxidative (4), (5), (6), (7), (8).

Prin obținerea unor forme de porumb noi, cu conținut ridicat de carotenoide, în mod deosebit cu carotenoide provitaminice, se va putea diversifica și îmbunătăți calitatea preparatelor alimentare pe bază de porumb, va crește competitivitatea porumbului românesc la export, creîndu-se astfel posibilitatea obținerii unor însemnate surse valutare. Rezolvarea acestei probleme ar aduce României prioritate pe plan mondial și ar reprezenta o contribuție reală, de mare importanță, pentru valorificarea superioară a porumbului.

St. cerc. biochim., 26, 1, 53–63 (1983)

Prezenta lucrare se încadrează în contextul unor preocupări mai largi ale autorilor de a stabili determinismul genetic al carotenoidelor la porumb, utilizînd pentru prima oară linii dihaploide, care reprezintă un material biologic pur din punct de vedere genetic (genic), perfect homozigot. Autorii urmăresc obținerea unor hibrizi de porumb noi, cu conținut ridicat de carotenoide provitaminice, prin încrucișarea liniilor dihaploide. Utilizarea liniilor dihaploide reduce de 2—3 ori (substanțial) timpul de obținere a noilor hibrizi de porumb.

MATERIAL ȘI METODE

Ca material biologic s-au folosit 12 provenienţe hibride de porumb de la S.C.A. Turda, utilizate de noi ca material inițial pentru obținerea liniilor dihaploide, precum și 12 linii dihaploide, derivate de la trei din aceste provenienţe hibride (EWE, T-35 și T-41).

Pentru extragerea carotenoidelor, boabele uscate de porumb s-au măcinat, iar făina obținută s-a cîntărit și s-a umectat. Extragerea carotenoidelor din făina umectată s-a făcut cu un amestec de acetonă-eter de petrol-metanol, în raport de 6 : 3 : 1, pînă ce extractul a rămas incolor. Acetona și metanolul se îndepărtează din extractul primar de pigmenți prin spălări repetate cu apă, în pîlnia de separare. Pigmenții carotenoidici dizolvați în eterul de petrol se usucă prin trecerea soluției peste un strat de Na_2SO_4 anhidru, pentru captarea urmelor de apă.

Pentru separarea și purificarea pigmenților s-a folosit în cea mai mare parte cromatografia pe coloană, utilizîndu-se ca adsorbant amestec de oxid de magneziu și nisip fin, în raport de 2 : 1 în greutate. Developarea coloanelor s-a făcut cu amestec de eter de petrol și acetonă, în concentrație crescîndă pînă la 20% acetonă, în funcție de tasarea materialului inițial. Pentru purificarea și identificarea carotenoidelor s-a folosit și cromatografia în strat subțire, utilizîndu-se ca adsorbant oxid de magneziu, silicagel și gips deshidratat, în raport de 1 : 1 : 0,5. Ca developant al plăcilor s-a folosit amestec de eter de petrol-acetonă-metanol, în raport de 20 : 3 : 1.

Saponificarea pigmenților carotenoidici s-a făcut la întuneric, cu soluție etanolică de hidroxid de potasiu 8%, timp de 12 ore, la temperatura camerei.

Identificarea și determinarea conținutului carotenoidelor s-au efectuat prin metode cromatografice și spectroscopice, la fel ca în lucrări anterioare (9), (10), (11), 12).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Conținutul pigmenților carotenoidici din materialul inițial hibrid utilizat pentru obținerea liniilor dihaploide este prezentat în tabela 1, în μg/g boabe uscate.

Din cercetările efectuate reiese existența unei mari variabilități între diferitele provenienţe de porumb hibride atît în ceea ce privește conținutul total al pigmenților carotenoidici, cît și în ceea ce privește conținutul diferitelor carotenoide. Acest fapt indică existența unor diferențieri genetice între provenienţele de porumb hibride în privința factorilor care determină biosinteza carotenoidelor, oferind în acest fel posibilitatea utilizării lor pentru izolarea unor genotipuri, prin consangvinizare sau derivare de linii dihaploide, care să se caracterizeze printr-un conținut ridicat de carotenoide. În mod deosebit s-au evidențiat din acest punct de vedere provenienţele hibride Pioneer, Cistron, T-35 și Sintetic 3/4.

Unele provenienţe, deși cu un conținut total de carotenoide mai scăzut, au un conținut mai bogat în privința unor pigmenți, fapt ce poate

Tabela 1

Conținutul carotenoidelor din materialul inițial hibrid, utilizat pentru obținerea liniilor dihaploide

Nr. crt.	Materialul inițial (proveniența hibridă)	Conținutul în carotenoide, în μg/g boabe						Total carotenoide
		epoxizi	zeaxantină	luteină	criptoxantină	carotenoide hidrocarburice	total carotenoide provitaminice	
1	Sintetic 1/3	1,28	7,18	5,98	1,13	0,32	1,45	15,89
2	Sintetic 3/4	2,73	8,78	7,80	1,72	0,80	2,52	24,83
3	Solto	1,40	6,01	8,16	1,86	0,76	2,62	18,19
4	Cistron	2,35	9,42	13,65	2,20	1,30	3,50	28,93
5	Brutus	1,80	6,86	4,50	1,52	0,04	1,56	14,72
6	Pioneer	2,73	11,32	13,57	2,80	1,02	3,83	31,44
7	EWE	1,43	5,44	5,04	1,28	0,93	2,21	14,12
8	ETA	1,64	5,02	8,28	1,36	0,43	1,81	16,75
9	A—303	1,55	8,55	10,08	1,53	0,80	2,33	22,51
10	B.C.	2,12	7,07	16,68	2,41	2,64	5,05	20,92
11	T—35	2,44	12,88	9,98	2,05	0,88	2,93	28,33
12	T—41	1,85	7,84	3,16	0,76	0,53	1,29	14,14

să prezinte interes practic pentru obținerea unor linii și hibrizi de porumb care să se caracterizeze printr-un conținut mai ridicat în pigmenții respectivi, în raport cu destinația ce urmează a fi dată porumbului. Un exemplu în acest sens îl constituie hibridul B.C., care, deși are un conținut total de carotenoide scăzut, prezintă un conținut relativ ridicat de luteină.

Un conținut mai ridicat în carotenoide provitaminice totale au provenienețele hibride B.C., Pioneer, Cistron, T-35, Solto.

Sărace în carotenoide sînt provenienețele hibride Sintetic 1/3, Brutus, EWE și T-41, atît sub aspectul conținutului total de pigmenți, cît și pe diferite fracțiuni.

Conținutul în carotenoide al liniilor de porumb dihaploide derivate de la trei provenienețe hibride (EWE, T-41 și T-35) se prezintă în tabela 2.

Martorul este reprezentat de materialul hibrid inițial, de la care a derivat fiecare grup de linii: provenienețele hibride EWE și T-41 se caracterizează printr-un conținut scăzut de carotenoide, iar proveniența T-35 are un conținut ridicat de carotenoide.

Interesant de remarcat este faptul că, prin mecanismul de derivare a liniilor dihaploide, a crescut conținutul în pigmenți carotenoidici totali și provitaminici, comparativ cu materialul inițial de la care au derivat. Din acest punct de vedere se evidențiază în mod deosebit liniile 3178, 3227 și 3260, derivate din materialul inițial hibrid sărac în carotenoide (EWE și T-41). La aceste linii, conținutul în carotenoide totale și pe fracțiuni depășește de trei pînă la aproape cinci ori martorul. Un conținut ridicat de carotenoide totale are și linia 3324, care a derivat de la materialul inițial T-35, mai bogat în carotenoide decît provenienețele hibride anterioare (EWE și T-41).

Între diferitele linii dihaploide derivate de la același material inițial, sub aspectul conținutului în carotenoide totale și provitaminice, există de asemenea un grad relativ ridicat de variabilitate, fără ca acest con-

Tabela 2

Conținutul în carotenoide al liniilor de porumb dihaploide, derivate de la un material inițial hibrid

Linia	Originea (proveniența hibridă)	Conținutul în carotenoide (μg/g) boabe						Total carotenoide
		epoxizi	zeaxantină	luteină	criptoxantină	carotenoide hidrocarburice	total carotenoide provitaminice	
3137	EWE	4,69	18,22	13,45	2,30	2,40	4,70	41,04
3178	EWE	2,77	23,02	17,86	3,72	5,67	9,39	53,04
3213	EWE	4,50	14,26	12,61	2,99	3,82	6,81	38,18
3227	EWE	3,95	25,45	13,78	3,56	5,04	8,64	51,78
Martor	—	1,43	5,44	5,04	1,28	0,93	2,21	14,12
3294	T—35	2,52	10,24	13,14	5,68	4,03	9,71	35,61
3334	T—35	1,56	14,47	12,44	4,03	2,37	6,40	34,87
3285	T—35	1,96	10,40	13,91	3,01	1,39	4,40	30,67
3324	T—35	1,53	22,34	16,34	6,78	4,03	10,81	51,02
3329	T—35	1,54	21,06	14,25	7,56	4,48	12,04	48,89
3333	T—35	2,44	15,86	12,15	6,86	3,98	10,84	41,29
Martor	—	2,44	12,98	9,98	2,05	0,88	2,93	28,33
3248	T—41	3,89	12,26	15,26	2,33	4,91	7,24	38,65
3260	T—41	4,46	14,47	20,64	8,00	4,84	12,84	52,41
Martor	—	1,85	7,84	3,16	0,76	0,53	1,29	14,14

ținut să scadă sub valoarea martorului. La unele linii însă, conținutul unor fracțiuni carotenoidice se situează sub valoarea materialului de origine. Astfel, în cazul liniilor 3334, 3285, 3324 și 3329, conținutul în epoxizi se situează sub valoarea martorului, iar în cazul liniilor 3294 și 3285 conținutul zeaxantinei se situează sub valoarea martorului. Deosebit de importantă este constatarea, cu largi aplicații practice, că conținutul total al carotenoidelor provitaminice din toate liniile dihaploide este cu mult mai mare decît în materialul inițial (martor), din care au derivat.

Dacă posibilitatea obținerii unor linii dihaploide cu conținut ridicat în carotenoide, în urma recombinărilor meiotice ce pot să apară la materialul hibrid, din punct de vedere teoretic a fost de așteptat, creșterea conținutului carotenoidelor totale și al celor provitaminice la toate liniile dihaploide derivate nu s-a prevăzut anterior. Ținînd seama că nu s-a făcut o selecție a materialului în direcția sporirii conținutului în carotenoide, intensificarea biosintezei și a acumulării carotenoidelor prin mecanismul de derivare a liniilor dihaploide nu poate fi pusă pe seama întîmplării. Fenomenul trebuie să aibă și o altă explicație, pe care deocamdată nu ne încumetăm să o prezentăm. Considerăm că faptul semnalat merită toată atenția, putînd avea implicații teoretice și practice extrem de importante pentru obținerea unor linii și hibrizi de porumb noi, cu

conținut ridicat de carotenoide totale și provitaminice, într-un timp mai scurt decît cel necesar pentru obținerea unor hibrizi de porumb, prin metodele clasice (tradiționale) de ameliorare a porumbului.

CONCLUZII

1. Materialul inițial, obținut la S.C.A. Turda, prezintă un grad ridicat de variabilitate sub aspectul felului și al conținutului pigmenților carotenoidici, oferind posibilitatea obținerii unor linii și apoi a unor hibrizi de porumb dihaploizi, cu conținut ridicat în carotenoide totale și provitaminice.

2. Între liniile dihaploide derivate de la același material inițial există de asemenea un grad relativ ridicat de variabilitate atît în privința conținutului total de carotenoide, cît și a conținutului diferiților pigmenți carotenoidici.

3. Conținutul cel mai ridicat în carotenoide totale, în comparație cu provenientele hibride originale, de la care au derivat, îl au liniile dihaploide 3178, 3260, 3227 și 3324.

4. Rezultatele obținute sînt utile pentru procesul de ameliorare a porumbului, în vederea obținerii unor noi forme de porumb (linii și hibrizi), calitativ superioare celor existente, cu conținut ridicat de carotenoide provitaminice.

Prezentat la redacție
la 5 iunie 1982

Disciplina de biochimie vegetală,
Institutul agronomic „Dr. Petru Groza", Cluj-Napoca
* *Disciplina de genetică și ameliorare a plantelor,*
Institutul agronomic „Dr. Petru Groza", Cluj-Napoca
și
** *Department of Food Science and Technology,*
University Rhode Island, Kingston, R.I.02881, S.U.A.

CAROTENOID PIGMENT CONTENT OF SEVERAL HYBRID-MAIZE SOURCES AND OF THE DIHAPLOID LINES DERIVED

SUMMARY

There were analysed the carotenoid pigments of 12 hybrid sources of diploid maize and of 12 dihaploid lines derived from the previous hybrid sources, in order to obtain data on the genetic determinism of carotenoid biosynthesis as the aim was that of obtaining new varieties of maize with high contents of provitamin carotenoids.

In all dihaploid lines, the total provitamin carotenoid content, having a higher biological value than the other types of carotenoids, is superior to that of the original stock from which they were derived.

Through the derivation mechanism of the dihaploid lines, the content of total carotenoids as well as that of provitamin ones increases; then, new maize hybrids, of high carotenoid contents, were measured against the stock they were started from.

BIBLIOGRAFIE

1. I. CĂBULEA, *Proceedings of the fifth meeting of the maize and sorghum section of Eucarpia*, sub red. I. KOVACS, Akadémiai Kiadó, Budapest, 1971, p. 85.
2. C. O. GROGAN, C. W. BLESSIN, Crop Science, **8**, 730 (1968).
3. T. MUREȘAN, GH. SIPOȘ, FL. PAULIAN, I. MOGA, *Cultura porumbului*, Edit. „Ceres", București, 1973, p. 26.
4. C. BODEA, GH. ILLYES, C. BILĂUȘ, I. CĂBULEA, Rev. roum. Biochim., **5**, 11 (1968).
5. T. W. GOODWIN, *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, Academic Press, London—New York, ed. a 2-a, vol. I, 1976, p. 624.
6. N. I. KRINSKY, *Carotenoids*, sub red. O. ISLER, Birkhäuser Verlag, Basel—Stuttgart, 1971, p. 669.
7. G. NEAMȚU, *Biochimie vegetală*, Edit. „Ceres", București, 1981, p. 200.
8. F. W. QUACKENBUSH, J. G. FIRCH, W. J. RABOURN, M. McQUISTAN, E. N. PETZOLD, T. E. KAGRL, J. Agr. Food Chem., **9**, 132 (1961).
9. A. M. BRUNSON, F. W. QUACKENBUSH, Crop Science, **2**, 344 (1962).
10. R. G. LEE, G. NEAMȚU, T. C. LEE, K. L. SIMPSON, Rev. roum. Biochim., **15**, 287 (1978).
11. G. NEAMȚU, GH. ILLYES, St. cerc. biochim., **23**, 63 (1980).
12. G. NEAMȚU, GH. BÂLTAN, Z. NAGY, GH. ILLYES, V. MICLEA, Rev. roum. Biochim., **18**, 125 (1981).

β-GALACTOZIDAZA DIN *LACTOBACILLUS BULGARICUS*. IZOLARE ȘI PURIFICARE PARȚIALĂ

ANCA ROȘEANU, MAGDALENA LUNGU, S. S. VASU*

Rezumat. β-Galactozidaza din *Lactobacillus bulgaricus* a fost obținută prin creșterea microorganismului pe un mediu sintetic și purificată parțial prin precipitare fracționată cu sulfat de amoniu. Enzima astfel obținută produce hidroliza lactozei din laptele alimentar. Enzima este sensibilă la îngheț-dezgheț și își pierde 30% din activitate după 7 zile de păstrare la 4°C.

β-Galactozidaza (EC 3.2.1.23, β-galactozid galactohidrolaza) este o enzimă de mare importanță în metabolismul streptococilor și al lactobacililor de tip lactic, deoarece inițierea creșterii în lapte — mediul lor natural — este dependentă de această enzimă (1).

Lactoza din lapte este transformată de aceste microorganisme în acid lactic, proces ce stă la baza obținerii unor produse lactate fermentate. Este de așteptat ca aceste microorganisme să posede în echipamentul lor enzimatic și β-galactozidaza.

În prezenta lucrare ne-am propus obținerea și purificarea parțială a acestei enzime din *Lactobacillus bulgaricus*, în vederea studierii posibilității de utilizare a unui astfel de preparat enzimatic la hidroliza lactozei din laptele alimentar.

MATERIAL ȘI METODE

Microorganisme utilizate: *Lactobacillus bulgaricus* din colecția Institutului de cercetări pentru industrie și chimie alimentară.

Obținerea culturilor de *L. bulgaricus*. Culturile de *L. bulgaricus* au fost obținute prin creșterea timp de 12 ore la 40°C a 0,5 g celule într-un mediu lichid sterilizat 15 min la 121°C. Mediul de cultură conține 0,5 g lactoză, 1,0 g triptonă, 0,250 g extract de drojdie, 0,2 g NaCl, 0,025 g acid ascorbic la 50 ml apă distilată, pH-ul mediului a fost ajustat la 7.

Prelucrarea culturilor de *L. bulgaricus*. a) *Obținerea suspensiei celulare.* Culturile de celule au fost centrifugate 20 min la 4 000 rot/min.

b) *Obținerea suspensiei celulare tratate cu toluen.* 4 ml suspensie celulară în tampon fosfat 0,1 M, pH 7, a fost tratată cu 0,2 ml soluție de toluen în acetonă (10%) și agitată timp de 5 min. În suspensia astfel tratată s-a determinat imediat activitatea lactazică.

c) *Obținerea extractului acelular.* Suspensia celulară a fost supusă sonicării 5 min într-un sonicator tip MSE, amplitudine 6. Pereții celulari au fost îndepărtați prin centrifugare 15 min la 4 000 rot/min. În supernatantul obținut s-a determinat activitatea β-galactozidazică.

d) *Precipitarea cu* $(NH_4)_2SO_4$. β-Galactozidaza a fost parțial purificată prin precipitare cu $(NH_4)_2SO_4$. La extractul acelular s-a adăugat sarea solidă, după care amestecul s-a ținut o oră la 4°C. În aceste condiții, enzima activă a fost precipitată cu $(HN_4)_2SO_4$ 2,5 M. Fracțiunea enzimatic activă a fost resuspendată în tampon fosfat 0,1 M, pH 7.

Determinarea activității β-galactozidazice. Metoda de determinare a activității lactazice se bazează pe dozarea glucozei eliberate în urma acțiunii enzimei asupra lactozei (2). O unitate

de activitate enzimatică (UE) este cantitatea de enzimă care eliberează 1 μmol glucoză/min/ml/37°C.

Mediul de reacție conține 600 μmoli substrat și 0,5 ml enzimă. Se incubă 30 min la 37°C, după care reacția se stopează prin fierbere timp de 2 min. La martor soluția enzimatică luată în lucru este fiartă și răcită.

La 0,5 ml amestec de reacție se adaugă 1,0 ml reactivi OPG (ortodianisidină — peroxidază — glucozoxidază) și se incubă 5 min la 30°C. Reacția se stopează cu 2,0 ml H_2SO_4 10 N. Se fotocolorimetrează probele la 525 nm față de martor de reactivi.

Glucoza eliberată în urma reacției se poate calcula utilizînd o curbă standard pentru reactivi.

Concentrația proteică a preparatelor s-a determinat prin metoda Lowry, utilizînd albumina serică bovină ca proteină standard (3).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Obținerea β-galactozidazei din *Lactobacillus bulgaricus*

Celulele de *L. bulgaricus* crescute 12 ore la 40°C pe un mediu lichid au fost spălate de trei ori cu tampon fosfat 0,1 M, pH 7 și resuspendate în același tampon. Suspensia de celule a fost supusă sonicării timp de 5 min. Resturile celulare s-au îndepărtat prin centrifugare 15 min la 4 000 rot/min. Extractul acelular, suspensia celulară și lichidul de cultură au fost testate din punctul de vedere al activității lactazice (tabela 1).

Tabela 1

β-Galactozidaza din *L. Bulgaricus*

Cultura pură	Lichidul de cultură (AE)	Suspensia celulară (AE)	Celule tratate cu toluen + acetonă (AE)	Suspensia acelulară (AE)
L. bulgaricus	0	0,56	0,64	0,78

AE = activitate enzimatică exprimată în unități enzimatice/ml/min.

Se observă că activitatea enzimatică este prezentă în omogenat (suspensia celulară) în suspensia celulară tratată cu toluen + acetonă și în suspensia acelulară. Deci, și în celulele crescute pe mediul lichid se observă aceeași comportare a enzimei față de diferitele tratamente (sonicare, permeabilitate).

Deoarece activitatea lactazică este mai bună în suspensia acelulară, aceasta va fi supusă precipitării cu $(NH_4)_2SO_4$ pentru purificarea parțială a enzimei.

Purificarea parțială a β-galactozidazei din *L. bulgaricus*

Purificarea parțială a β-galactozidatei din *L. bulgaricus* s-a făcut prin fracționare cu $(NH_4)_2SO_4$, conform modului descris la „Material și metode". Rezultatele obținute sînt indicate în tabela 2.

Tabela 2

Purificarea parțială a β-galactozidazei din *L. bulgaricus*

Etapa de purificare	Activitate lactozică (UE/ml)	Proteina (mg/ml)	Activitate specifică (UE/mg)
Lichid de cultură	0	8,8	0
Extract celular	0,50	2,1	0,23
Extract celular tratat cu toluen+acetonă	0,56	1,9	0,30
Extract acelular	0,74	2,2	0,34
Fracționare cu $(NH_4)_2SO_4$	0,41	0,22	1,8

Se observă că precipitarea cu $(NH_4)_2SO_4$ duce la creșterea activității enzimatice specifice de aproximativ opt ori față de activitatea inițială.

Hidroliza lactozei din lapte alimentar

Eficiența lactazei din *Lactobacillus bulgaricus* a fost verificată prin acțiunea și asupra lactozei din laptele alimentar (tabela 3). Rezultatele au fost comparate cu gradul de hidroliză produs de lactaza din *Aspergillus niger* (4).

Tabela 3

Acțiunea β-galactozidazei asupra lactozei din lapte

β-Galactozidaza	Lactoză hidrolizată (%)	
	lapte alimentar	soluție lactoză 4,8%
Lactobacillus * *bulgaricus*	15	18
Aspergillus ** *niger*	12	16

Condiții : * o oră incubare la 37°C, pH-ul enzimei 7 ;
** o oră incubare la 37°C, pH-ul enzimei 4,0.

Se observă că β-galactozidaza produce în condiții identice de incubare (o oră la 37°C) un grad ceva mai înalt de hidroliză a lactozei în cazul enzimei obținute din *Lactobacillus bulgaricus*. Acest lucru se datorează pH-ului optim de acțiune al lactozei bacteriene (pH 7), mai apropiat de pH-ul laptelui (pH 6,5) decît cel al lactozei din *Aspergillus niger* (pH 4,0).

Conservabilitatea

β-Galactozidaza obținută din *Lactobacillus bulgaricus* a fost testată după purificarea parțială din punctul de vedere al stabilității. Enzima a

fost păstrată la 4°C și la —20°C. Din timp în timp a fost testată activitatea lactazică. S-a constatat că înghețarea și dezghețarea duc la pierderea aproape în întregime a activității enzimatice. În ceea ce privește păstrarea la 4°C, se observă o scădere în timp a activității, ajungîndu-se după 7 zile la 70% din activitatea inițială. O asemenea comportare a fost observată și de Mc Fetters pentru β-galactozidaza din *Streptococcus lactis* 7962.

CONCLUZII

1. Dintre culturile pure testate din punctul de vedere al activității lactazice, cel mai bun producător este *Lactobacillus bulgaricus*.

2. A fost obținută și purificată parțial lactaza din *L. bulgaricus* crescut pe un mediu lichid 12 ore la 40°C.

3. Lactaza din *L. bulgaricus* produce aproximativ același grad de hidroliză al lactozei din laptele alimentar cu cel produs de β-galactozidaza din *Aspergillus niger*.

4. Enzima din *L. bulgaricus* este sensibilă la înghețare-dezghețare și își pierde aproximativ 30% din activitate după 7 zile de depozitare la 4°C. Se impune în continuare efectuarea de studii în vederea măririi gradului de stabilitate al enzimei.

Prezentat la redacție
la 30 septembrie 1982

Institutul de științe biologice, București
și
* *Universitatea din Galați, Catedra de biochimie*

β-GALACTOSIDASE FROM *LACTOBACILLUS BULGARICUS*. ISOLATION AND PARTIAL PURIFICATION

SUMMARY

β-Galactosidase from *Lactobacillus bulgaricus* was isolated and partially purified by precipitation with $(NH_4)_2SO_4$.

The enzyme produces the hydrolysis of milk lactose.

The enzyme is sensitive at freezing-defreezing and loses 30% of its activity after 7 days of storage at 4°C.

BIBLIOGRAFIE

1. G. A. McFETTERS, W. E. SANDINE, P. L. ELLIKER, J. Bacteriol., **93**, 3 (1967).
2. R. R. BURTON, Anal. Biochem., **14**, 258 (1966).
3. H. O. LOWRY, N. J. ROSENBROUGH, A. L. FARR, R. J. RANDALL, J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951).
4. A. ROȘEANU, M. LUNGU, S. S. VASU, St. cerc. biochim., **25**, *1*, 47 (1982).

STUDIUL COMPARATIV AL PREPARATELOR DE CATALAZĂ IMOBILIZATĂ PE MEMBRANE DE COLAGEN PRIN LEGARE COVALENTĂ SAU PRIN INCLUDERE

HORST D. SCHELL, GABRIELA ANGEL*, VIOLETA GOVOREANU*

Rezumat. Studiind două preparate de catalază imobilizată pe colagen, realizate prin două metode (legare covalentă și includere), se constată apariția unei stabilități mai crescute față de acțiunea unor agenți denaturați și inhibitori (variație de pH, temperaturi crescute, hidroxilamină), în comparație cu enzima liberă. Efectul de stabilizare a macromoleculei proteice enzimatic active, apărut în urma imobilizării, este mai pronunțat la catalaza imobilizată prin legare covalentă de suportul solid. Colagenul s-a dovedit a fi un bun suport pentru imobilizări de enzime. Preparatele enzimatice imobilizate obținute își păstrează activitatea lor catalitică chiar după mai multe refolosiri, putînd fi îndepărtate ușor și complet în orice moment din mediul de reacție.

Din varietatea mare de suporturi folosite la imobilizări de enzime și de alte substanțe biologic active, un loc deosebit îl ocupă colagenul prin numeroasele sale avantaje pe care le prezintă față de acestea (1), (2).

Astfel, pe lîngă faptul că are un preț de cost relativ redus și poate fi obținut, în funcție de necesități, sub diferite forme (fibre, membrane, granule etc.), colagenul manifestă prin natura sa proteică un efect protector și stabilizant asupra macromoleculei proteice a enzimelor, permite cuplarea acestora în condiții foarte blînde, care nu afectează activitatea catalitică și structura chimică a acestor macromolecule biologic active, asigură prin caracterul său hidrofil pronunțat o bună difuzie a substratelor și a produselor de reacție, prezintă posibilitatea de reticulare cu agenți bifuncționali, ceea ce duce la o creștere a rezistenței sale mecanice.

Ținînd seama de toate aceste avantaje ale colagenului, în lucrarea de față l-am folosit pentru obținerea a două tipuri de catalază imobilizată, realizate fie prin legare covalentă de membrane de colagen, fie prin simpla includere a enzimei în ochiurile rețelei tridimensionale a acestora.

MATERIAL ȘI METODE

Imobilizarea catalazei prin legare covalentă de membrane de colagen. Membrane de colagen cu greutate uscată de 0,16 g, rezultate din reconstituirea colagenului din piele bovină, conținut în 20 ml soluție 0,8% de colagen în acid acetic 0,5 M, se tratează cu 50 mg clorhidrat de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimidă (Serva Feinbiochemica, Heidelberg, R.F.G.) și cu 0,2 ml soluție 2% de catalază din ficat bovin (Fluka, A. G. Buchs, Elveția). Se ajustează pH-ul mediului de reacție la o valoare de 4,5—6,0 și se lasă amestecul de reacție peste noapte la temperatura camerei. A doua zi, conjugatul enzimatic rezultat se spală alternativ și de repetate ori cu apă distilată și cu o soluție de clorură de sodiu 0,5 M, pînă la îndepărtarea completă a enzimei nelegate; se păstrează apoi pînă la folosire într-o soluție de tampon fosfat 0,01 M, pH 7,0, sau numai în apă distilată la 4—5°C.

Imobilizarea catalazei prin includere în membrane de colagen. Se adaugă 0,2 ml soluție 2% de catalază în 20 ml soluție de colagen 0,8% încă înaintea reconstituirii acestuia. Enzima va fi imobilizată prin simpla includere mecanică în ochiurile rețelei tridimensionale, care se formează cu ocazia reconstituirii colagenului sub formă de membrană. După uscare, membrana enzimatică rezultată se spală pînă la îndepărtarea completă a catalazei nereținute în porii gelului, preparatul enzimatic păstrîndu-se în condițiile arătate pentru cel obținut prin legare covalentă.

Determinarea activității catalitice a catalazei libere și imobilizate s-a realizat după metoda propusă de Sinha (3), metodă care se bazează pe dozarea colorimetrică la 570 nm a acetatului cromic rezultat în urma acțiunii H_2O_2 asupra bicromatului de potasiu în mediu acetic și la cald, activitatea enzimatică exprimîndu-se în μmoli H_2O_2 descompusă/min/mg enzimă la 25°C sau în moli H_2O_2 descompusă/min/g preparat enzimatic imobilizat.

Variația activității catalazei libere și mobilizate în funcție de timpul de reacție s-a urmărit în condițiile arătate, stopîndu-se reacția la 1, 2 și 3 min.

Variația activității catalizei libere și imobilizate în funcție de pH-ul mediului de reacție a fost urmărită determinîndu-se activitatea enzimatică la următoarele valori de pH, realizate cu un tampon acetat-veronal: 5,3, 6,3, 7,0, 7,9, 8,5 și 9,5.

Determinarea influenței procedeului de imobilizare asupra termostabilității catalazei imobilizate s-a efectuat prin urmărirea activității catalitice a enzimei libere și a preparatelor ei imobilizate după o prealabilă preincubare, timp de 30 min, la următoarele temperaturi: 45, 55, 65 și 75°C.

Determinarea variației activității catalazei libere și imobilizate în funcție de concentrația substratului s-a realizat folosindu-se ca substrat următoarele concentrații de H_2O_2 în tampon fosfat 0,01 M, pH 7,0: 0,02, 0,04, 0,06, 0,08 și 0,1 M.

Acțiunea hidroxilaminei asupra activității catalazei libere și imobilizate s-a urmărit folosindu-se în mediul de reacție concentrații crescînde ale acestui inhibitor de sinteză al catalazei sub forma de clorhidrat ($NH_2OH \cdot HCl$, Merck, Darmstadt, R.F.G.), situate la 0,02, 0,04, 0,06, 0,08, 0,10, 0,15 mM în cazul enzimei libere și la 0,03, 0,06, 0,10 și 0,16 mM în cazul preparatelor imobilizate ale catalazei.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Cele două preparate de catalază imobilizată, obținute fie prin legarea covalentă a enzimei de membrane de colagen, fie prin simpla înglobare în ochiurile rețelei tridimensionale a membranelor de colagen, sînt catalitic active și prezintă activități enzimatice reziduale de 1125 și, respectiv, 1250 μmoli H_2O_2 descompusă min/g preparat enzimatic imobilizat la același conținut de enzimă în preparatele imobilizate (60 mg/g = 6%). Din aceste date rezultă totodată că prin legare covalentă enzima are o activitate catalitică reziduală ceva mai scăzută (19%) decît enzima inclusă doar mecanic (23%), datorită intervenției unor factori sterici apăruți în urma cuplării moleculei proteice a enzimei de suportul insolubil.

Urmărind comparativ variația activității enzimatice a catalazei libere și a celor două preparate imobilizate în funcție de timpul de reacție (fig. 1), se constată o creștere a stabilității catalazei față de acțiunea substratului în urma imobilizării ei, efect care este mai pronunțat la preparatul unde molecula enzimei a fost stabilizată suplimentar și prin legături covalente (fig. 1, *c*). Astfel, în timp ce catalaza liberă pierde după 2 min de reacție 43% din activitatea ei inițială, catalaza imobilizată prin includere în membrana de colagen pierde în aceste condiții doar 30% din activitatea reziduală inițială, iar cea legată covalent pierde și mai puțin din activitatea ei inițială, și anume 19%. După 3 min de reacție, cînd enzima liberă mai păstrează doar 40% din activitatea inițială, cea imobilizată prin includere menține încă 55%, iar cea legată covalent chiar 68% din activitatea inițială.

O creştere a stabilităţii catalazei imobilizate în comparaţie cu cea liberă, în funcţie de timpul de reacţie, a fost observată şi la enzima imobilizată pe celuloză activată cu BrCN (4), care după 9 min de reacţie pierde doar 10% din activitatea ei iniţială, în timp ce enzima liberă îşi reduce în aceste condiţii activitatea cu 40%.

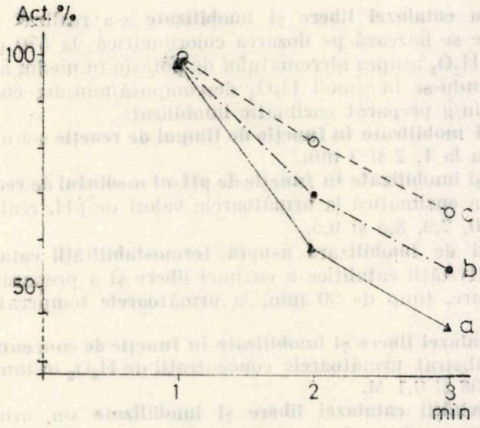


Fig. 1. — Variaţia activităţii enzimatice în funcţie de timpul de reacţie a enzimei libere (*a*) şi imobilizate pe colagen prin includere (*b*) sau legare covalentă (*c*).

Urmărind influenţa variaţiei de pH a mediului de reacţie asupra activităţii catalazei libere şi imobilizate (fig. 2), se constată în urma imobilizării o deplasare de pH optim cu 0,5 unităţi spre un domeniu mai alcalin în cazul ambelor preparate imobilizate. O deplasare a pH-ului optim de acţiune a catalazei spre un domeniu mai alcalin, în urma imobilizării, a mai fost semnalată de noi (5) şi de alţi autori (6) şi în cazul folosirii altor suporturi solide. Din figura 2 mai rezultă că prin imobilizare,

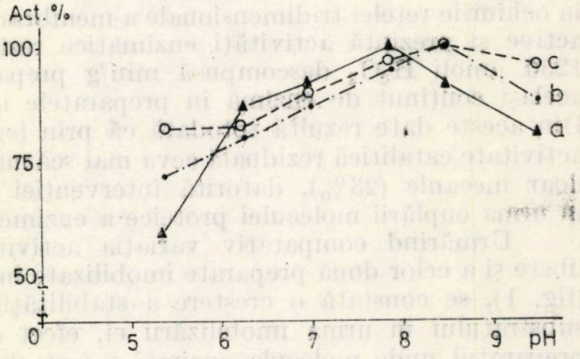


Fig. 2. — Variaţia activităţii enzimatice în funcţie de pH-ul mediului de reacţie a enzimei libere (*a*) şi imobilizate pe colagen prin includere (*b*) sau legare covalentă (*c*).

indiferent de metoda folosită, catalaza devine mai stabilă faţă de variaţiile de pH în comparaţie cu enzima liberă, atît în domenii mai acide cît şi mai alcaline.

Studiind influenţa diferitelor temperaturi de preincubare asupra activităţii enzimatice a catalazei libere şi imobilizate prin legare covalentă de membrane de colagen (fig. 3), se observă şi în acest caz o protejare a moleculei proteice a enzimei în urma imobilizării, exprimată printr-o

creştere a termostabilităţii. Aşa, de pildă, după o preincubare de 30 min la 65°C, enzima legată covalent mai păstrează 22% din activitatea ei iniţială, cea nelegată prezentînd în aceste condiţii doar un rest de activitate enzimatică (3%). Interesant de amintit cu această ocazie este şi faptul că preparatul enzimatic imobilizat obţinut prin includere mecanică a

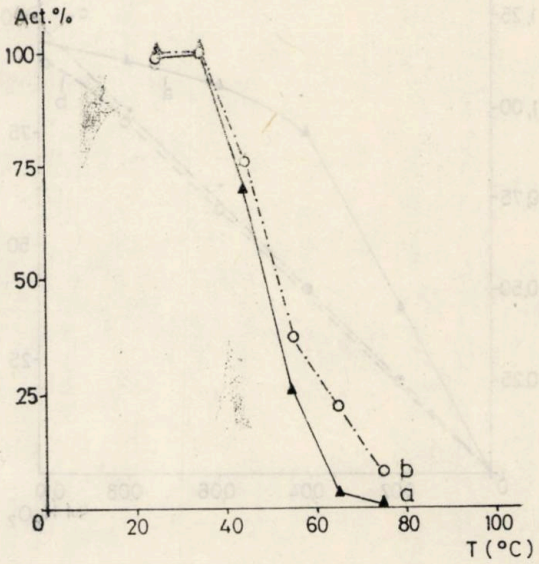


Fig. 3. — Influenţa temperaturii de preincubare (durata 30 min) asupra activităţii catalazei libere (*a*) şi imobilizate prin legare covalentă de membrane de colagen (*b*).

catalazei în membrane de colagen nu rezistă la temperaturi mai mari de 30—35°C, dezagregîndu-se. Faptul că preparatul obţinut prin legarea covalentă a catalazei de membrane de colagen îşi menţine consistenţa şi la 75°C şi chiar la temperaturi mai ridicate înseamnă că, prin reacţia cu carbodiimidă, odată cu legarea enzimei de molecula de colagen, s-au reticulat şi moleculele de colagen, formîndu-se o reţea tridimensională insolubilă şi termostabilă.

În figura 4 se prezintă variaţia activităţii enzimatice a catalazei libere şi imobilizate în funcţie de concentraţia de substrat. În cazul enzimei libere, se observă la concentraţii mai mici de substrat o creştere rapidă şi lineară a activităţii, prin mărirea concentraţiei substratului, curba urmînd apoi o traiectorie hiperbolică. La preparatele enzimatice imobilizate, activitatea catalitică creşte practic linear cu creşterea concentraţiei de substrat pe tot parcursul concentraţiilor folosite.

În sfîrşit, figura 5 redă comportarea celor două preparate imobilizate ale catalazei şi a catalazei libere faţă de hidroxilamină, inhibitor de sinteză al catalazei. Datele experimentale obţinute evidenţiază două aspecte : se remarcă apariţia şi în acest caz a unei rezistenţe crescute a catalazei faţă de acţiunea inhibitoare a hidroxilaminei în urma imobilizării ei, iar pe de altă parte, o comportare diferenţiată a celor două preparate imobilizate în funcţie de metoda de imobilizare folosită. Astfel, la o concentraţie de hidroxilamină corespunzătoare la 0,06 mM în mediul de reacţie, catalaza liberă pierde 60% din activitatea ei iniţială, în timp ce enzima

imobilizată prin includere pierde doar 35%, iar cea imobilizată prin legare covalentă numai 12% din activitatea ei în absenţa inhibitorului. La o concentraţie corespunzătoare de 10 mM hidroxilamină, cînd enzima

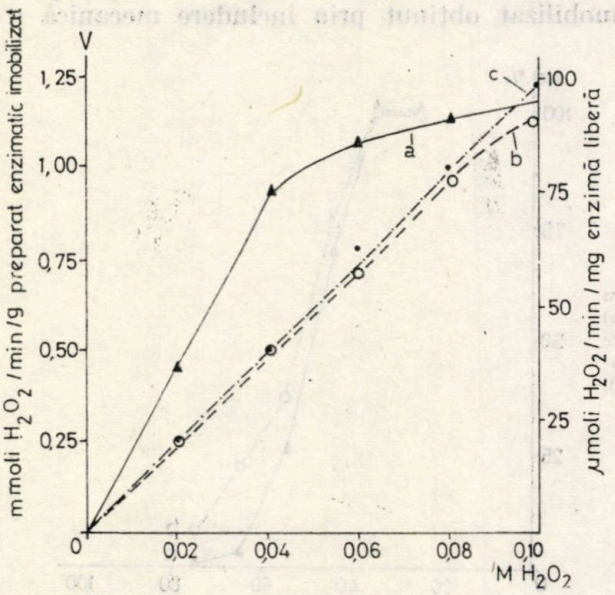


Fig. 4. — Variaţia activităţii catalitice în funcţie de concentraţia de substrat (H_2O_2) la catalaza liberă (*a*) şi imobilizată pe colagen prin legare covalentă (*b*) sau includere (*c*).

liberă mai prezintă o activitate doar de 25%, preparatele enzimatice imobilizate mai păstrează încă 50 şi, respectiv, 75%. Şi în acest caz efectul

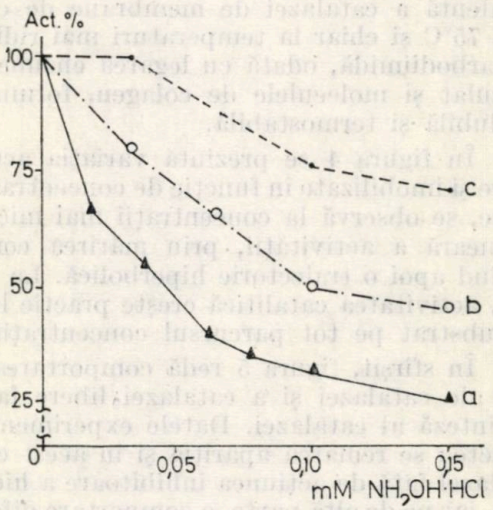


Fig. 5. — Influenţa diferitelor concentraţii de hidroxilamină asupra activităţii catalazei libere (*a*) şi imobilizate pe colagen prin includere (*b*) sau legare covalentă (*c*).

de stabilizare a moleculei proteice a enzimei este mai pronunţat în urma imobilizării la enzima fixată prin legături covalente de suportul solid.

CONCLUZII

1. Imobilizînd catalaza, fie prin legare covalentă de membrane de colagen, fie prin includere mecanică în ochiurile rețelei tridimensionale a colagenului în cursul reconstituirii sale, se obțin preparate enzimatic active cu activitate catalitică reziduală de 19 și, respectiv, 23%.

2. Prin imobilizare, catalaza își deplasează pH-ul optim de acțiune cu 0,5 unități spre domenii mai alcaline, devenind totodată și mai stabilă la pH-uri mai acide sau mai alcaline.

3. În urma legării covalente de colagen, catalaza devine mai termostabilă în comparație cu enzima liberă.

4. Ambele preparate de catalază imobilizată sînt mai rezistente față de acțiunea inhibitoare a hidroxilaminei decît enzima liberă.

5. Efectul de stabilizare față de diferiții agenți fizici sau chimici de denaturare, în urma imobilizării, apare întotdeauna mai pronunțat la enzima imobilizată prin legare covalentă de suportul solid decît la cea inclusă doar mecanic.

6. Preparatele de catalază imobilizată își păstrează activitatea catalitică și după repetate refolosiri, putînd fi ușor și complet îndepărtate în orice moment din mediul de reacție.

Prezentat la redacție
la 6 decembrie 1982

Institutul de științe biologice,
Laboratorul de biologie moleculară,
77748 București 17, Splaiul Independenței nr. 296
și
**Universitatea București,*
Facultatea de fizică,
Secția de biofizică

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNG DER DURCH KOVALENTE BINDUNG ODER EINSCHLUSS IN KOLLAGENMEMBRANE ERHALTENEN IMMOBILISIERTEN KATALASE—PRÄPARATE

ZUSAMMENFASSUNG

Bei der vergleichenden Untersuchung von zwei an Kollagenmembrane immobilisierten Katalasepräparaten, die auf verschiedene Weise erhalten wurden (kovalente Bindung, bzw. Einschluss), konnte bei den immobilisierten Präparaten im Vergleich zum freien Enzym eine grössere Stabilität gegenüber der Einwirkung denaturierender Faktoren und Hemmstoffen (Schwankung des pH-Wertes, erhöhte Temperaturen, Hydoxylamin) beobachtet werden. Die nach der Immobilisierung beobachtete Stabilisierung des Enzymmoleküls ist bei der durch kovalente Bindung fixierten Katalase ausgeprägter, als bei der nur mechanisch eingeschlossenen.

Das Kollagen hat sich als ein zufriedenstellender Träger zur Fixierung von Enzymen erwiesen. Die erhaltenen trägerfixierten Enzympräparate bewahren ihre katalytische Aktivität auch nach zahlreichen

Wiederverwendungen und können zu jeder Zeit leicht und vollständig aus dem Reaktionsansatz entferent werden.

BIBLIOGRAFIE

1. K. HOI-KAU LEE, *Grefage covalent d'enzymes sur films de collagène activés par divers agents : le réactif „K" de Woodward on un dérivé de carbodiimides*, teză de doctorat, Lyon, 1974, p. 16.
2. W. R. VIETH, K. VENKATASUBRAMANIAN, *Collagen-Immobilized Enzyme Systems*, în *Methods in Enzymology*, vol. XLIV, sub red. K. MOSBACH, Academic Press, New York—San Francisco—London, 1976, p. 243.
3. A. K. SINHA, Anal. Biochem., **47**, 389 (1972).
4. H. D. SCHELL, A. TURCU, M. PELE, D. POPESCU, Cellulose Chem. Technol., **11**, 331 (1977).
5. H. D. SCHELL, S. M. TEODOSIU, Rev. roum. Biochim., **19**, 69 (1982).
6. R. A. ALIEV, V. S. GASEV, D. G. SVIAGINTSEV, Vest. Mosk. Univ., **2**, 67 (1976).

R. OLINESCU, *Peroxidarea în chimie, biologie și medicină* (Peroxidation in Chemistry, Biology and Medicine), Edit., științifică și enciclopedică, București, 1982, 239 p.

Rezultatul unei munci de 11 ani de studiu în domeniul peroxidării, lucrarea îmbrățișează un domeniu foarte larg, trecînd în revistă numeroase și diverse procese peroxidative. Astfel, sînt prezentate procese din industria chimică, alimentară, din practica medicală, precum și din biologie, în cea mai largă accepție a termenului. Această prezentare se face în mod critic, selectiv, cu mult discernămînt. Autorul își sprijină lucrarea pe un fond bibliografic masiv, cele 1 000 de titluri anunțate fiind în realitate cu mult mai semnificative decît ar putea să pară, căci este vorba de o bibliografie selectivă realizată de un specialist dintre cei mai avizați. Lucrarea este prima de acest fel în limba română și, după cunoștințele noastre, deși există în literatura mondială unele înrudite, nici una de acest profil nu a fost încă editată în altă parte.

Remarcăm în structura cărții unele capitole de o importanță deosebită și care beneficiază de o tratare aparte, cum ar fi „Activarea oxigenului". În acest capitol, autorul prezintă precis, sugestiv și concentrat caracteristicile fizice, chimice și biochimice ale oxigenului și ale diverșilor săi compuși, astfel încît implicațiile sale peroxidative să poată fi înțelese foarte bine. Descrierea procesului de peroxidare ca proces biochimic își face loc abia după o succintă prezentare a proceselor chimice de peroxidare. Aceasta, alături de studierea factorilor care influențează peroxidarea, face ca problema peroxidării biochimice să fie definită în termeni deosebit de precișI. Prezentarea peroxizilor, antioxidanților, radiațiilor UV și ionizante ca factori peroxidanți etc. constituie elemente care caracterizează procesul în mod foarte exact. Alegerea acestor aspecte vorbește prin sine. Lucrarea are însă un corolar în capitolele referitoare la procesele biochimice, normale și patologice, interpretările fiind deosebit de originale și riguroase și constituind o frumoasă pagină de biochimie scrisă cu competență și realism.

Evident, ca orice lucrare ce abordează problema fundamentale, și lucrarea de față sfîrșește prin a schița unele aspecte practice. Este cazul determinării peroxizilor și a antioxidanților naturali, precum și al prezentării stărilor patologice. Din punctul de vedere al formei, remarcăm exprimarea precisă și elegantă și de asemenea selecția unui material ilustrativ deosebit de sugestiv și ușor de urmărit. Exprimarea mai are și calitatea spiritului de răspundere al autorului față de limba folosită, nefiind practicat sistemul neologismului abuziv sau cel, atît de neelegant, al folosirii termenului străin. Toate aceste aspecte fac din lucrarea dr. Olinescu o lucrare cu o ținută științifică deosebită și de o evidentă utilitate pentru biochimie.

Mihai Zamfir

C. STOICESCU, *Farmacodinamia apelor minerale de cură internă din România*, Edit. Academiei, București, 1982, 211 p.

Lucrarea se înscrie ca problematică în orientarea și preocupările de adîncire a studiului mecanismelor de acțiune a factorilor de mediu asupra organismului, în scopul folosirii acestora la asigurarea stării de sănătate a populației.

Cunoașterea farmacodinamiei apelor minerale românești, în vederea promovării și valorificării lor în profilaxie, terapie și recuperare medicală, este un obiectiv de mare actualitate din punct de vedere teoretic și practic.

Lucrarea cuprinde cinci capitole : Primul, „Apa și sărurile minerale în natură și în organism", expune circuitul geologic, hidrologic și biologic al apei și sărurilor minerale, relațiile dintre structurile geologice și apele minerale, clasificarea acestora și zonele hidrogeologice din România. Următoarele trei capitole tratează separat principalele ape minerale românești : bicarbonatate, clorurate și sulfurate. Pentru fiecare categorie sînt prezentate și apele corespunzătoare din străinătate. Fiecare capitol este alcătuit după aceeași schemă : originea și clasifica-

rea apelor respective, acțiunea farmacodinamică asupra stomacului, enzimelor gastrice, motilității gastrointestinale, hepatocitului, colerezei și metabolismului. Ultimul capitol evidențiază contribuția școlii românești de balneologie la studiul și valorificarea apelor minerale autohtone și menționează îmbogățirea patrimoniului universal al acestei ramuri a științelor medicale prin contribuția școlii românești de balneologie.

Prin conținutul ei și prin modul de prezentare, lucrarea se adresează unui cerc larg din domeniul medicinii și biologiei.

Teodora Vâlsănescu

Neuronal-glial Cell Interrelationships (Interrelațiile neuron-celulă glială), sub red. T. A. SEARS, Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1982, 375 p., 13 fig., 5 foto, 8 tab.

Cartea cuprinde o serie de comunicări prezentate la o sesiune științifică ce a avut loc între 30 noiembrie și 5 decembrie 1981 la Berlin. Scopul acestei sesiuni a fost de a examina relațiile existente între neuroni și celulele gliale și modificările acestor relații în diverse maladii, în special în „scleroza multiplă" sau „scleroza în plăci".

Volumul începe cu o scurtă prezentare a conferințelor Dahlem, fundate în 1974 sub conducerea lui Silke Bernhard.

Sînt expuse criteriile de participare la aceste conferințe, scopul lor, modul de organizare a întîlnirilor științifice.

Urmează cîteva date privind personalitatea lui Stephen W. Kuffer (1913—1980), cercetător remarcabil, care timp de 40 de ani a făcut multiple studii anatomice, fiziologice, biochimice și imunologice asupra sistemului nervos. În introducere, editorul T. A. Sears, de la Institutul de neurologie din Londra, a arătat că volumul reprezintă lucrările unui mic grup de oameni de știință, care au pus în discuție interrelațiile neuron-celulă glială și modul cum aceste relații sînt afectate în „scleroza în plăci".

Editorul face o scurtă caracterizare a acestei maladii, arătînd că în ultimii 10 ani s-au întreprins numeroase cercetări avînd ca scop, în primul rînd, descoperirea etiologiei bolii și, în al doilea rînd, tratamentul efectelor ei. Cercetările întreprinse au urmărit de asemenea schimbările care au loc la nivel celular din punct de vedere anatomic, fiziologic și biochimic.

Caracterul larg interdisciplinar al cercetării a dus la apariția unei noi discipline științifice — neuroștiința.

În lucrarea sa cuprinsă în acest volum, W. I. McDonald de la Institutul de neurologie din Londra prezintă problemele clinice ale „sclerozei în plăci", arătînd că probabil agentul inițiator al bolii este de natură infecțioasă (poate un virus), dar că boala ar fi legată și de o dereglare a controlului imun, deoarece există evidențierea că distrugerea tecilor de mielină observată în această boală este mediată imunologic.

Autorul arată de asemenea că în prezent nu se cunoaște încă modul de interacțiune a factorilor mediului înconjurător cu factorii genetici în dezvoltarea progresivă a bolii.

În continuare, cartea cuprinde patru mari capitole, în care o serie de cercetători își expun lucrările în legătură cu :

— factorii care pot afecta relația neuron-celulă glială încă din perioada de dezvoltare ontogenetică a sistemului nervos ;

— factorii care pot interveni în menținerea funcțiunii normale a sistemului nervos ;

— factorii care pot produce lezarea celulei nervoase sau a celulelor gliale ;

— factorii care pot produce sau influența refacerea prejudiciilor aduse sistemului nervos.

Volumul se încheie cu lista participanților la lucrare și cu două indexuri privind autorii citați și subiectele discutate.

Este un mare merit al editorului de a fi cuprins în această carte o serie de lucrări valoroase, reprezentînd cercetări de ultimă oră asupra unei boli atît de grele și încă atît de necunoscută cum este „scleroza în plăci".

Elisabeta Mihăilescu

The Renin Angiotensin System in the Brain. A Model for the Synthesis of Peptides in the Brain (Sistemul renină-angiotensină din creier. Un model de sinteză a peptidelor în creier), sub red. D. GANTEN, M. PRINTZ, M. I. PHILLIPS, B. A. SCHÖLKENS, Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1982, 385 p., 108 fig., 46 tab.

Volumul de față cuprinde o serie de lucrări originale care demonstrează pentru prima oară existența în creier a unui sistem renină-angiotensină (R.A.S.).

Acest sistem a fost mult timp subiectul unor mari controverse; elucidarea problemei s-a bazat pe studii recente neurologice, farmacologice, fiziologice și endocrinologiee.

Primele publicații despre prezența în creier a reninei, a angiotensinogenului și a substanțelor asemănătoare angiotensinei au apărut acum aproape zece ani. Ele au coincis cu descoperirea noilor acțiuni biologice ale angiotensinei în creier și cu reinvestigarea efectelor deja cunoscute ale angiotensinei. Posibilitatea ca angiotensina să fie generată în creier, ca și popularitatea căpătată în timp de neuropeptide, a dus la dezvoltarea cercetărilor din acest domeniu.

De asemenea, datorită unor cercetări intense asupra sistemului renină-angiotensină din rinichi și plasmă, cunoștințele despre sistemul renină-angiotensină din creier par a fi mult mai avansate în cîteva aspecte decît ceea ce se cunoaște despre multe alte neuropeptide.

Sistemul renină-angiotensină din creier poate fi considerat ca model de sistem enzimă-peptidă.

Cartea începe cu o lucrare de ordin general, în care enzimele, precursorii proteici cu greutate moleculară mare, peptidele efectoare, ca și receptorii lor sînt bine caracterizați pentru sistemul renină-angiotensină din creier.

Sînt expuse de asemenea efectele biologice ale componentelor R.A.S., situsul de acțiune, precum și agenții farmacologici care interferă cu acest sistem *in vivo*.

Această introducere în problemă face ca volumul să fie mai ușor accesibil pentru cei ce nu sînt direct implicați în acest domeniu de cercetare.

Semnificația cercetărilor întreprinse în legătură cu R.A.S. constă în contribuția lor la înțelegerea sintezei, distribuției și fiziologiei neuropeptidazelor.

Diversele funcțiuni care pot fi atribuite acestui sistem — de la rolul său în patofiziologia hipertensiunii pînă la modificările pe care le produce în ceea ce privește memoria și setea — fac ca informațiile cuprinse în această carte să fie de un profund interes atît pentru cercetători, cît și pentru medicii interniști și psihiatri.

Elisabeta Mihăilescu

Advances in anatomy, embryology and cell biology, sub red. F. BECK, W. HILD, J. van LIMBORGH, R. ORTMANN, J. E. PAULY, T. H. SCHIEBLER, vol. 74: J. ALTMAN, S. A. BAYER, *Development of the cranial nerve ganglia and related nuclei in the rat* (Dezvoltarea ganglionilor nervoși cranieni și a centrilor nervoși conecși la șobolan), Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1982, 90 p., 64 fig.

În acest volum este cuprins un studiu amplu asupra morfogenezei și dezvoltării sistemului nervos periferic cranial-medular.

Autorii folosesc tehnica de marcare „in toto" cu timidină tritiată pentru evaluarea cantitativă a neuronilor produși în zile succesive în cursul dezvoltării embrionare pornind de la ziua a 11-a, zi în care s-a desăvîrșit schița capului la embrionul de șobolan. Prin compararea proporției de neuroni marcați și nemarcați din diferitele teritorii embrionare corespunzătoare ganglionilor nervoși cranieni la anumite vîrste ale dezvoltării embrionare, autorii au determinat momentul apariției neuronilor de origine din ganglionii trigeminal, facial, glosofaringian și vag.

În lumina acestor rezultate s-au putut face relații de cronologie între formarea acestor structuri periferice și apariția nucleelor conexe de neuroni motori și de asociație, situate în etajele superioare ale măduvei.

În sfîrșit, este analizată problema originii celulelor ganglionare. Autorii conchid că toți ganglionii nervoși cranieni derivă din placode, și nu din crestele neurale, conform unei concepții larg răspîndite.

Placodele reprezintă îngroșări regionale ale epiteliului embrionar din regiunea capului în legătură cu receptorii cutanați. Crestele neurale sînt considerate a fi sursa unui sistem tranzitoriu embrionar nonneuronal, reprezentînd în ultimă instanță ariile de origine aparentă a nervi-

lor cranieni și fiind în realitate o sursă de celule Schwann pentru tecile nervilor cranieni și de celule-satelit ce intră în alcătuirea ganglionilor cranieni și a nervilor micști.

Rezultatele acestor cercetări experimentale sînt prezentate în cinci capitole : „Dezvoltarea ganglionului trigeminal în legătură cu nucleii trigeminali", „Dezvoltarea ganglionului facial în legătură cu nucleul motor facial", „Dezvoltarea ganglionului vestibular în legătură cu nucleii vestibulari", „Dezvoltarea ganglionilor glosofaringian și vag în legătură cu nucleii solitar și ambiguu", „Aspect din dezvoltarea nucleului și nervului hipoglos". Aceste capitole sînt urmate de o „Discuție generală" și un „Rezumat". Volumul se încheie cu o listă de abrevieri, cîteva pagini dense de bibliografie și un index pe subiecte.

Iconografia constă din microfotografii la nivelul secțiunilor histologice prin piese de encefal embrionar de șobolan incluse în parafină sau metacrilat și din cîteva scheme sintetice care rezumă rezultatele cercetării. Imaginile histologice sînt deosebit de clare, convingătoare și bine alese.

Acest volum este util cercetătorilor în domeniul neurobiologiei și al embriologiei, reprezentînd un model de cercetare experimentală cu mijloace relativ modeste, dar conduse în mod judicios și cu rezultate spectaculoase prin noutate și implicații.

Paula Prunescu

Studies of brain function (Studii asupra funcției creierului), coordonator V. BRAITENBERG, sub red. H. B. BARLOW, H. BULLOCK, E. FLOREY, O.-J. GRÜSSER, A. PETERS, vol. 6 : M. ABELES, *Local Cortical Circuits. An Electrophysiological Study* (Circuite locale corticale. Studiu electrofiziologic), Springer-Verlag, Berlin — Heidelberg — New York, 1982, 102 p., 31 fig.

Cartea reprezintă o redactare monografică liberă, în sensul că însumează cercetările realizate în ultimii zece ani de o echipă de tineri specialiști, conduși de autor. Din acest motiv, capitolul de literatură nu este exhaustiv, iar discutarea marilor idei care tind să explice morfofiziologia circuitelor corticale locale se bazează în special pe ipotezele, cercetările și achizițiile experimentale ale autorului.

Cele zece capitole sînt intitulate : „Introducere", „Tehnici", „Impulsuri spontane ale neuronilor corticali", „Interacțiuni între perechile de celule", Răspunsuri la sunet", „Modele spațio-temporare ale activității", „Transmiterea informației prin coincidență", „Organizarea generatorilor de ECoG" (unde electrocorticale , „Coduri de informație pentru funcția superioară a creierului", „Concluzii".

Din capitolul „Concluzii" reținem ideea varietăților limitate ale legăturilor dintre celulele corticale, fapt care asigură întreaga varietate a activităților mentale și a memoriei, precum și ideea rezistenței la vătămare, care face ca legăturile interneuronale, numeroase și complexe, să funcționeze nealterate timp de zeci de ani în condițiile în care adulții pierd zilnic peste 100 000 de neuroni. O altă concluzie importantă se referă la organizarea rețelei neuronale corticale, care reprezintă un sistem bine organizat pe baza unui cod combinativ, care corespunde cu interacțiunile anatomice și fiziologice ale neuronilor corticali.

Cartea este utilă neuromorfologilor, neurofiziologilor, precum și specialiștilor în bionică și inteligență artificială.

C.-C. Prunescu

Archives of Toxicology. Supplement 5. New Toxicology for Old. A critique of Accepted Requirements and Methodology (Arhivele de toxicologie. Suplimentul 5. Noua toxicologie pentru bătrîni. O critică asupra necesităților acceptate și metodologia), Proceedings of the European Society of Toxicology — Meeting held in Dublin, August 17—19 1981, sub red. P. L. CHAMBERS, C. M. CHAMBERS, 394 p., 99 fig.

Cartea prezintă lucrările Conferinței Societății europene de toxicologie care s-a ținut la Dublin (Marea Britanie) în 17—19 mai 1981. Volumul are șapte capitole, în care sînt grupate lucrările pe anumite probleme. La sfîrșitul fiecărei lucrări se află o bogată bibliografie, adusă la zi cu ultimele noutăți.

În primul capitol se face o evaluare critică a metodelor utilizate în studiile de rutină asupra toxicității. În al doilea capitol sînt prezentate o serie de lucrări cu privire la neurotoxicologie, ca neurotoxicitatea substanțelor chimice industriale și contaminanților, aspectele mecanismelor biochimice și efectele lor, toxicologia sistemului nervos central, efectul cadmiului și fenobarbitalului asupra aldehid-reductazei cerebrale etc. În capitolele 4 și 5 se relatează despre tehnicile neinvazive și invazive în toxicologie, efectele drogurilor și medicamentelor în obstetrică și ginecologie, statisticile în toxicologie. În capitolul 6 se discută histopatologia agenților toxici. În ultimul capitol sînt grupate, sub titlul de „comunicări libere", o serie de lucrări cu privire la metabolismul arsenului anorganic la om, estimarea cafeinei în urină, cardiomiopatia congestivă datorită inhalării de tricloretilen, toxicitatea medicamentoasă și conducerea automobilului.

Cartea se încheie cu un index de autori și unul de subiecte.

Volumul cuprinde lucrări necesare chimiștilor, biologilor, medicilor și tuturor celor care lucrează în toxicologie.

Lucia Buzilă

Efecte sterice în biomolecule (Steric effects in biomolecules), sub red. G. NÁRAY-SZABÓ, Akadémiai Kiadó, The Publishing House of Hungarian Academy of Sciences, Budapesta (Hungary) and Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam (The Netherlands), 1982, 417 p.

Acest volum conține prelegerile prezentate de către oamenii de știință de renume internațional invitați la simpozionul asupra „Efectelor sterice în biomolecule", care a avut loc între 5 și 8 octombrie 1981 la Eger, în Ungaria, și unele materiale selectate din „postere". Scopul întîlnirii a fost să întrunească oameni de știință interesați în combinarea aplicării diferitelor metode experimentale și teoretice în probleme speciale de biochimie. Au fost discutate aspecte legate de cristalografia cu raze X, rezonanța magnetică de înaltă frecvență, dicroismul circular și calculul teoretic.

Subiectele abordate în aceste prelegeri se împart în trei domenii principale. În primul domeniu, care tratează despre „Molecule mici" și conține cel mai mare număr de lucrări, sînt incluse aspecte referitoare la : a) antibiotice (efecte sterice de transfer informațional intramolecular în antibiotice pe bază de tetraciclină; investigații asupra antibioticelor din seria eniatină și valinomicină; aspecte structurale ale transportului de ioni de către eniantina B); b) peptide (conformația dihidroergopeptinelor în cristale și soluție; interdependența dintre poziția lanțurilor și grupările funcționale care influențează activitatea biologică a peptidelor); c) hormoni (stereochimia și activitatea biologică a hormonilor hipotalamici); d) agenți farmaceutici activi (importanța neechilibrului conformațiilor în moleculele farmaceutic active; relație calitativă structură-activitate; studii asupra enzimelor proteolitice).

Al doilea domeniu se ocupă de studii asupra ADN și ARN, care cuprind probleme ca : aminoacetilarea ARNt — cît de sigur pot acționa enzimele; accesibilitatea față de potențialul electrostatic în ADN-B și -Z, respectiv față de potențialul electrostatic în ARN_t^{Phe}

În ultima parte, consacrată proteinelor, sînt expuse probleme legate de stereochimia cataliziei enzimatice, studii de rezonanță magnetică asupra părții active a subtilizinei și tiolsubtilizinei, calcule de cuantum chimic în mecanismul de acțiune al proteinazelor serinei, explicarea efectelor substituentului steric în reacția biopolimerilor, studii selective în cataliza biologică, cîmpul electric al α-helixurilor, dinamica și funcția proteinelor.

Fiecare lucrare conține un bogat material ilustrativ și bibliografic.

Volumul se încheie cu titlurile lucrărilor „postere" și cu un index de subiecte.

Deși modul de a aborda probleme interdisciplinare a devenit din ce în ce mai obișnuit în studiile fundamentale de chimie, în domeniul biochimiei au fost publicate un număr relativ restrîns de lucrări de acest fel. Din acest motiv, volumul de față constituie un început promițător, cu perspectiva de a fi continuat și lărgit în viitor.

Corina Mihail

Environmental carcinogens. Selected methods of analysis (Substanțe cancerigene din mediu. Metode de analiză), vol. 4 : *Some aromatic amines and azo dyes in the general and industrial environment* (Unele amine aromatice și azocoloranți din mediul înconjurător și industrial), IARC Scientific Publications No. 40, sub red. H. EGAN și colab., International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1981, 347 p.

Volumul reprezintă o trecere în revistă și, în același timp, o expunere analitică asupra unor amine aromatice și coloranți ce apar în mediul înconjurător și, îndeosebi, în cel industrial, substanțe cunoscute sau suspectate de a fi cancerigene. Editorii au acordat atenție, în primul rînd, compușilor incluși în monografiile IARC asupra evaluării riscului de cancerogeneză a substanțelor chimice la om.

Astfel sînt abordate cancerogeneza prin amine aromatice și azocoloranți, cu o listă a compușilor implicați, activarea metabolică a acestora, apariția și urmărirea lor în industrie, împreună cu efectuarea unor teste rapide pentru detectarea efectului cancerigen. Aminele heterociclice mutagene din alimente, 2-acetil-amino-fluorenul, fenacetina și coloranții alimentari, formează obiectele unor lucrări aparte din volum.

17 comunicări sînt consacrate studiului analitic al substanțelor în discuție și al compușilor metabolici derivați.

Vl. Gheordunescu

H. SCHÜTZ, *Benzodiazepines. A Handbook. Basic data, analytical methods, pharmacokinetics and comprehensive literature* (Benzodiazepinele. Un îndreptar. Date fundamentale, metode analitice, farmacocinetică și bibliografie selectivă), Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1982, 439 p., 152 fig.

Într-o formă sintetică, lucrarea pune la dispoziția celor interesați numeroase date, îndeosebi de interes practic, asupra acestei importante clase de substanțe. Sistematizarea unui material atît de vast și divers reprezintă prin ea însăși o reușită trecere în revistă și o lucrare extrem de utilă.

Volumul cuprinde capitole privitoare la formule și proprietăți fizice, biotransformare, produși de hidroliză ; figurează, de asemenea, un index al substanțelor tratate. Se acordă importanță analizelor fizico-chimice celor mai moderne și eficiente : cromatografie în strat subțire, gaz-cromatografie, spectre în IR, UV și de masă. Se adaugă un tabel al maximelor de absorbție.

Urmează prezentarea metodelor analitice pentru benzodiazepinele întrebuințate curent (menționîndu-se, pe scurt, procedeul), datele farmacodinamice din literatură, precum și indexarea bibliografiei consacrate acestor compuși de către autorii din domeniu : absorbție, metode analitice, efecte fiziologice de orice natură, toxicitate.

Lucrarea mai cuprinde liste alfabetice de trimiteri și un index pe subiecte.

Vl. Gheordunescu

Texas reports in biology and medicine, vol. 40, 1980—1981 : *Human hemoglobines and hemoglobinopathies. A* review to 1981 (Hemoglobine umane și hemoglobinopatii. O trecere în revistă pînă în 1981), sub red. R. G. SCHNEIDER, S. CHARACHE, W. A. SCHROEDER, Univ. of Texas Medical Branch at Galverston, 1981, 504 p.

În cei 30 de ani care au trecut de la descoperirea unei hemoglobine anormale drept cauza anemiei cu celule „în seceră", au fost descrise peste 350 de hemoglobine anormale și multe hemoglobinopatii, numărul lor fiind în continuă creștere. Pe măsură ce cunoștințele au avansat, au crescut și dificultățile. Încercînd să ușureze astfel de cercetări, un grup de experți au furnizat, prin lucrări de fond sau cu caracter special, acest compendiu al informației existente privind hemoglobinele umane și hemoglobinopatiile. Volumul apare în seria pe subiecte speciale publicate de Texas Reports on Biology and Medicine, cuprinzînd informația științifică apărută pînă în 1981.

Volumul are materialul organizat în 12 capitole : 1. *Hb normale*, articol de fond, scris de savantul Linus Pauling, referitor la Hb normale și hemoglobinopatii ; perspective asupra

evoluției Hb ; Hb embrionică ; Hb foetală (Hb F) ; distribuția celulară a HbF la adulți normali și cu hemoglobinopatii ; biosinteza HbF în culturi de celule provenind de la o linie clonală. 2. *Gene globinice umane*, localizare cromozomială ; structură și organizare ; modificare post-transcripțională a ARN globinic. 3. *Biosinteza și „transformarea" Hb*, rolul hemului în reglarea sintezei proteice la eucariote (inhibiția inițierii translației prin deficit în hem) ; procesul „transformării" Hb la animale (HbF → HbA) : implicarea eritropoetinei în acest proces. 4. *Hb mutante*, articol de fond (de W. Schroeder, editor) ; diferențierea Hb prin electroforeză în zonă și computerizarea datelor ; analiză structurală ; identificare imunochimică și cuantificarea variantelor Hb ; distribuția geografică și etnică a variantelor Hb umane, aspecte științifice și clinice (de S. Charache, editor) ale relației structură-funcție a Hb. 5. *Hb S și boala cu celule în „seceră"*, chimia fizică a procesului de gelificare a Hb „în seceră" (HbS), proces responsabil de patogeneza anemiei cu celule „în seceră" ; structura fibrelor de HbS ; efectul altor Hb asupra gelificării Hb celulelor „în seceră" ; gelificarea Hb ; diagnosticul prenatal al anemiei cu celule „în seceră" și al β-talasemiei ; menajarea sarcinii ; infecții ; accidente vasculare cerebrale în anemia cu celule „în seceră" ; noi încercări de terapie a bolii cu celule „în seceră" ; tratamentul extracorporal al eritrocitelor în anemia cu celule „în seceră". 6. *Talasemia*, sindroame ; α-talasemii ; defecte ADN și ARN în β^+ și β^0 talasemii ; administrarea clinică a β-talasemiei ; ștergerea genetică în persistența ereditară a HbF și în δβ talasemie ; 7. *Hb glicozitate*, articol de fond ; Hb glicozilate drept model de modificare a altor proteine. 8. *Membrana hematiei*, proteina membranară și organizarea în hematii normale și în hemoglobinopatii ; efectul Hb anormale asupra reglării prin membrană a hidratării celulare. 9. *Hb instabile*. 10. *Transportul oxigenului și utilizare*. 11. *Heterogenitatea volumului hematiei drept o reflectare a calității eritropoezei*. 12. *Hb*-ne *pe care le-am cunoscut*, capitol scris de H. Lehmann și R. G. Schneider (editor).

Fiecare capitol sugerează noi direcții de cercetare. Bibliografia este repartizată la sfîrșitul fiecărui subcapitol. Un index de autori și unul de subiecte completează acest valoros volum.

Victoria Dobre

Encyclopedia of plant physiology, new series, sub red. A. PIRSON și M. H. ZIMMERMAN, vol. 14, partea A : *Nucleic acids and proteins in plants*, I. *Structure, biochemistry and physiology of proteins* (Acizi nucleici și proteine în plante, I. Structura, biochimia și fiziologia proteinelor), sub red. D. BOUTLER și B. PARTHIER, Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1982, 768 p., 135 fig.

Acest volum este o adevărată enciclopedie a cunoștințelor noastre actuale privind domenii vaste și variate, dintre care citățm : genoamele plantelor, acizii nucleici, proteinele și virusurile, dezvoltarea seminței, diferențierea cloroplastelor și a peretelui celular, îmbătrînirea frunzei ș.a. Datele stricte de fiziologie vegetală se îmbină armonios cu date din biologia moleculară. această știință explozivă și penetrantă ce furnizează informații extrem de utile. Este cunoscut că în prezent plantele furnizează peste 70% din alimentația mondială, procent ce are tendința să crească odată cu creșterea populației. De asemenea, asistăm la accentuarea crizei energetice mondiale și la valorificarea tot mai diversificată a resurselor vegetale, motive pentru care se impune cu necesitate o cunoaștere cît mai aprofundată a proteinelor din plante și a proprietăților lor funcționale. Un alt argument în sprijinul acestei necesități este acela că amelioratorul din agricultură trebuie să recurgă la metode și practici dintre cele mai eficace, bazate pe genetica și tehnologia ADN-recombinat, interacțiunea dintre structura și funcția proteinelor din plante, ca și pe interrelația acestora cu organizarea și expresia genei, cu diferențierea celulei și dezvoltarea plantei.

Pe de altă parte, studiile asupra proteinelor și acizilor nucleici din plante vor continua în viitorii ani să fie o sursă de probleme importante în biologia celulară, în transportul intracelular, în relațiile structură-funcție, ca și în evoluția moleculară și biologia dezvoltării plantelor.

Capitolele cărții sînt prezentate autoritar și detaliat, iar organizarea atentă, abordarea sistematică și cuprinzătoare fac din carte o resursă valoroasă de informații pentru cercetătorii din diverse sectoare de activitate.

Textul, bine scris și ușor asimilabil, cu un stil lucid și logic, include numeroase ilustrații și tabele, ceea ce conferă cărții principala calitate ce se cere publicațiilor științifice : claritatea. Merită de asemenea menționate gama extrem de bogată de plante asupra cărora s-au efectuat experiențele, ca și diversitatea remarcabilă a aspectelor abordate, motiv pentru care volumul se constituie într-un excelent ghid la îndemîna biochimiștilor, a fiziologilor, a geneticienilor.

Cu toate că şi-au adus aportul 23 de autori, materialul extrem de vast a fost admirabil omogenizat de cei doi editori, în cuprinsul cărţii păstrîndu-se o terminologie şi o nomenclatură unitară.

Cartea cuprinde un noian de trimiteri bibliografice şi este prevăzută la sfîrşit cu un detaliat index de subiecte (25 p.), de autori (80 p.) şi unul cu denumirile plantelor, ceea ce permite o valorificare maximă a materialului inclus în carte.

Prin conţinutul său extrem de dens, prin descrierea coerentă, ca şi prin alte calităţi neredate în recenzie, dar degajate din text, volumul va rămîne, sîntem convinşi, pentru mulţi ani o lucrare de referinţă în domeniul biochimiei şi fiziologiei plantelor.

Ioana Hagima

W. P. D. LOGAN, *Cancer mortality by occupation and social class 1851—1971*, IARC Scientific Publications No. 36, Studies on Medical and Population Subjects No 44, London—Lyon, 1982.

Lucrarea, editată de W. P. D. Logan, foloseşte datele furnizate de biroul de recensămînt şi supraveghere a populaţiei din Marea Britanie şi este patronată de Agenţia internaţională pentru cercetarea cancerului a OMS.

Datele provin din Registrul general privind analiza moratalităţii pe decenii. Pentru primele patru decenii luate în studiu (1851—1891), cancerul nu a fost notat ca o cauză distinctă a morţii. În unele decenii nu au fost grupate cauzele de deces după categorii profesionale. Se discută şi cauzele impreciziilor sau erorilor strecurate în datele prezentate, între care menţionăm incertitudinile asupra ocupaţiei, dat fiind că s-a luat în considerare numai ultima ocupaţie, adeseori foarte recentă.

Lucrarea, care cuprinde 253 de pagini, este constituită în marea majoritate din grafice şi tabele, care ilustrează creşterea sau variaţia mortalităţii din cauza neoplasmelor, pe organe şi categorii profesionale sau sociale, ca şi pe sexe.

Complexitatea situaţiilor, prezentate sintetic în sute de grafice şi tabele, face ca acest document să fie lipsit de concluzii propriu-zise. Fiecare tabel sau grafic reprezintă o concluzie ce poate fi descifrată de cititorul interesat.

Cartea este utilă pentru oncologi, administratori sanitari şi sociologi.

C.-C. Prunescu

SELTMANN G. în colaborare cu O. KÜHNEMUND şi R. REISSBRODT, *Die bakterielle Zellwand* (Peretele celular al bacteriilor), VEB Gustav Fischer-Verlag, Jena, 1982, 80 fig., 18 tab., 207 p.

Monografia de faţă întruneşte toate cunoştinţele esenţiale obţinute în ultimii ani prin cercetări de fină analiză biochimică şi microscopie electronică asupra structurii şi semnificaţiei funcţionale a peretelui celular bacterian. Lucrarea este împărţită în opt capitole :

Capitolul 1 prezintă generalităţi asupra morfologiei peretelui bacterian.

Capitolul 2 se ocupă de straturile rigide ale învelişului bacteriilor gram-pozitive şi gram-negative. Se face o prezentare a metodelor de izolare şi studiu al peptidoglicanilor şi părţilor peptidice din compoziţia peretelui bacterian. Urmează apoi studiul biosintezei acestor componente şi mecanismele de reglare ale biosintezei. În sfîrşit, autorul analizează situaţia concretă a tecii rigide a holobacteriilor şi a metanbacteriilor şi consideră structura mureinei ca tip clasic de peptidoglican.

Capitolele 3 şi 4 sînt cele mai extinse, alcătuind corpul propriu-zis al monografiei. Pornind de la diferenţele de afinitate tinctorială, cu profunde implicaţii în comportamentul biologic al bacteriilor şi rezistenţa lor la tratamentele chimioterapiei, autorul face o analiză amănunţită asupra compoziţiei chimice pînă la nivel molecular a structurilor celor două tipuri de perete bacterian. În capitolul 3 se face o analiză minuţioasă a acizilor graşi, cerurilor, gliceridelor, fosfolipidelor şi glicolipidelor. Urmează un studiu al biosintezei diferitelor componente ale peretelui bacterian la bacteriile gram-negative, biosinteza polizaharidului specific de tip S şi supravegherea genetică a acestei biosinteze.

O pondere specială o are, în cadrul acestui capitol, componenta proteică din structurile bacteriene din afara membranei. Astfel, este trecut în revistă antigenul comun al enterobacteriaceelor, sînt descrise metode de izolare și analiză a proteinelor. Se face prezentarea tipurilor de proteine din peretele celular al bacteriilor gram-negative conform rezultatelor prezentate la simpozionul de la Tübingen, din 1979. Urmează date despre biosinteza proteinelor, schema genetică și modelul de reglare a biosintezelor, modelul de organizare a proteinelor din structurile aflate în afara membranei bacteriene.

În capitolul 4 se prezintă peretele bacterian al bacteriilor gram-pozitive. La analiza componentelor cunoscute din izolările biochimice se remarcă atenția deosebită acordată cerurilor și o discuție la obiect asupra micobacteriilor.

Se analizează de asemenea proteinele caracteristice, antigenul polizaharidic și proteinele streptococilor, tuberculina.

O pondere însemnată în acest capitol o are analiza structurii, funcției și modelului de legare și integrare în structura peretelui, a acidului teichoic.

În capitolul 5 se analizează compoziția și structura materialelor capsulare și modalitățile de izolare și purificare. Sînt apoi trecute în revistă tipurile de capsulă de la *E. coli*, *Klebsiella*, *Haemophilus*, de la stafilococi și pneumococi. Capitolul se încheie cu observații asupra biosintezei substanțelor capsulare. O atenție specială este acordată glicocalixului.

Capitolul 6 se ocupă cu structurile specializate ale peretelui celular bacterian : flagelul, fimbriile și pilii.

În capitolul 7 se prezintă sintetic modelul general de perete celular la bacteriile gram-negative și la bacteriile gram-pozitive.

În sfîrșit, capitolul 8 face o trecere în revistă a semnificației funcționale a peretelui celular la bacterii. Sînt analizate funcția de apărare, de organ de transport, semnificația peretelui celular pentru patogenitatea și virulența bacteriană, adeziunea bacteriilor la suprafața și capacitatea lor de pătrundere la nivelul țesuturilor. De asemenea sînt studiate creșterea și multiplicarea bacteriilor în mediu, rezistența față de mecanismele de eliminare ale gazdei, leziunile produse gazdei și rolul fiecărui component al peretelui bacterian în această acțiune. În ultimele două subcapitole se abordează problema rolului peretelui celular în menținerea integrității celulei bacteriene și relația dinamică dintre peretele bacterian și bacteriofag.

Bibliografia este indicată pe capitole. Lucrarea se încheie cu un supliment de date de ultimă oră, indicate de asemenea, pe capitole, și un index de subiecte.

Ținuta generală a monografiei este foarte sobră, cele 80 de figuri și 18 tabele reprezentînd în marea lor majoritate scheme ale structurilor biochimice ale componentelor peretelui celular, microelectronografii sau modelele unor structuri biologice extrem de complexe ale peretelui bacterian.

Această lucrare reprezintă un document care atestă perseverența și minuțiozitatea conlucrării specialiștilor în biofizică, biochimie, microbiologie, pentru stabilirea cît mai exactă a structurii și compoziției chimice a peretelui celular al bacteriilor. De aceea, ea are o valoare deosebită de cunoaștere pentru biolog în general și pentru cercetătorii interesați în probleme de patogenitate și virulență a microorganismelor și de rezistență a acestora la tratamentele chimice și antibiotice.

Paula Prunescu

„Studii și cercetări de biochimie" publică articole originale la nivel științific superior din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici, ca : *Viața științifică*, în care prin note scurte sînt aduse la cunoștință cititorilor unele manifestări din domeniul biochimiei : congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experiență între cercetătorii români și cei străini etc., *Recenzii*, în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în țară și peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugați să înainteze articolele, notele și recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuș, pe hîrtie de calc. Tabelele și ilustrațiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planșe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea acelorași date în text, tabele și grafice. Explicația figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de inițiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanțelor internaționale.

Responsabilitatea asupra conținutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondența privind manuscrisele, schimbul de publicații etc. se va trimite pe adresa Comitetului de redacție : 78200, București 2, P.O.B. 2–2.

ÎN CURS DE APARIȚIE LA EDITURA ACADEMIEI:

TIBERIU TRANDABURU, **Histofiziologia comparată a pancreasului endocrin**

Din 1869, anul descoperirii insulelor pancreatice de către Paul Langerhans, pînă în prezent, studiul morfofiziologiei pancreasului endocrin a stat permanent în atenția oamenilor de știință, cauza principală constituind-o sindromul diabetului zaharat, cu multiplele sale dereglări endocrino-metabolice. Dacă relația dintre diabet și starea funcțională a celulelor producătoare de insulină și glucagon nu mai comportă discuții, rolul fiziologic al altor tipuri de celule insulare fie că a fost relativ recent clarificat, fie că face încă obiectul investigațiilor imediate. Ne referim atît la celulele D, unanim recunoscute în ultimii ani ca sursă de somatostatină, cît și la celulele PP, considerate a secreta un nou hormon polipeptidic, cu efecte parțial cunoscute.

Lucrarea, care se înscrie ca o primă sinteză cu caracter monografic în acest domeniu modern de cercetare, prezintă sistematizat stadiul actual al cunoștințelor, pune în discuție problematica în curs de rezolvare, conturează perspectivele deschise practicii medicale de investigare comparată a citofiziologiei insulelor pancreatice. Informațiile inserate în paginile cărții sînt din punct de vedere teoretic importante pentru înțelegerea evoluției mecanismelor intime care guvernează activitatea pancreasului endocrin în seria vertebratelor, constituind în același timp un îndreptar util pentru specialiștii din clinicile și laboratoarele de profil.

RM—ISSN 0049—2396

ST. CERC. BIOCHIM., TOMUL 26, NR. 1, P. 1—84, BUCUREȘTI, IANUARIE—IUNIE 1983

c. 1074 „I. P. Informația" 43816 Lei 30

1330 L:040403

studii şi cercetări de biochimie

2

TOMUL 26

1983

IULIE—DECEMBRIE

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

St. cerc. biochim., tomul 26, nr. 2, p. 85—198, 1983, Bucureşti

SCBIAS 26(2), 1983

39

COMITETUL DE REDACŢIE

Redactor responsabil:

academician E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUŞANSCHI

Membri:

EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; M. MEZINCESCU; I. VASILESCU; VICTORIA ALEXANDRESCU

Secretar de redacţie:

CECILIA MOTAŞ

Revista apare de două ori pe an.
În ţară, abonamentele se fac la oficiile poştale.
Cititorii din străinătate se pot abona adresîndu-se la ILEXIM, Departamentul Export-Import Presă, P.O. Box 136—137, telex 11226, 79517 — Bucureşti, str. 13 Decembrie nr. 3.

Manualele, cărţile şi revistele pentru schimb, precum şi orice corespondenţă se vor trimite pe adresa Comitetului de redacţie al revistei „Studii şi cercetări de biochimie" Bucureşti, P.O. Box 2-2, 78200 — Bucureşti 2, România.

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA
Bucureşti, Calea Victoriei nr. 125, sectorul 1, cod 79717

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

B I O C H I M I E

Tomul 26, nr. 2 1983

IULIE—DECEMBRIE

SUMAR

VLAD ARTENIE, COSTICĂ MISĂILĂ, Activitatea unor enzime digestive la păstrăvul curcubeu (*Salmo gairdneri* Rich.), furajat cu hrană concentrată conţinînd făină de alge 87

DANIELA BĂNĂŢEANU, HORST D. SCHELL, TRAIAN BENŢIA, RALUCA M. SCRIPCĂ-CRISTOF, Izolarea unui inhibitor natural al proteazelor din *Helix pomatia* prin cromatografie de afinitate utilizînd ca suport afin α-chimotripsina imobilizată pe alcool polivinilic reticulat 92

JEANA CIOPRAGA, OFELIA GOZIA, H. D. SCHELL, Studiul catalitic al invertazei imobilizate pe membrană de colagen 101

ELENA GANEA, MARIA ANDRAŞ, Degradarea catepsinei B_1 umane de către tripsină. 108

VL. GHEORDUNESCU, ANGELA ŞOAITĂ, Influenţa toluenului şi a altor solvenţi organici asupra activităţii ATP-azei Mg^{2+}-dependente din drojdia de bere. . . 115

MARIA GREABU, Fosfataza acidă lizozomală în şocul toxico-septic 124

IRINA ZAMFIRESCU, IOANA GOMOIU, OFELIA GOZIA, JEANA CIOPRAGA, HORST D. SCHELL, Selectarea unei tulpini de *Aspergillus niger* înalt producătoare de glucozoxidază în vederea purificării şi imobilizării enzimei pe o membrană de colagen (nota I) 129

OFELIA GOZIA, JEANA CIOPRAGA, HORST D. SCHELL, Obţinerea unui preparat imobilizat al glucozoxidazei din *Aspergillus niger* şi caracterizarea sa catalitică (nota II) 135

IOANA HAGIMA, Corelaţii între aneuploidie şi polimorfismul enzimatic la grîu. . . . 141

MAGDALENA LUNGU, ANCA ROŞEANU, ELENA SĂSĂRMAN, ANA IONIŢĂ, ŞTEFANA JURCOANE, SILVIA HORIŢĂ, Dinamica unor activităţi enzimatice la producătorul de lizină *Corynebacterium melassecola* cultivat în condiţii diferite de mediu 145

M. A. MATEESCU, H. D. SCHELL, ELENA ENACHE, T. BENŢIA, TEODORA VĂLSĂNESCU, V. ZARCHIEVICI, CARMEN ROTARU, Metodă rapidă pentru determinarea selectivă a α-amilazei utilizînd substrate reticulate condiţionate sub formă de tablete (notă preliminară) 156

ERSILIA MUNTEANU, VICTORIA CIURDARU, CORNEL BODEA, Studii asupra compuşilor steroidici din planta şi culturile de ţesuturi de *Solanum laciniatum* Ait. 160

R. OLINESCU, T. GÎDOIU, T. SAFTA, S. NIŢĂ, S. A. HULEA, Mecanisme biochimice implicate în acţiunea farmacodinamică a propolisului. II. Modificări în urma administrării în doză unică şi repetată 166

HORST D. SCHELL, TEREZIA BENE, Studiul comparativ al proprietăţilor catalitice ale α-amilazei libere şi imobilizate pe alcool polivinilic reticulat. 173

M. TĂMAŞ, I. MARINESCU, Asupra conţinutului de flavone din mugurii de plop . . 182

RECENZII 186

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

B I O C H I M I E

Tome 26, No. 2 1983

JULY — DECEMBER

CONTENTS

VLAD ARTENIE, COSTICĂ MISĂILĂ, The activity of some digestive enzymes in rainbow trout *(Salmo gairdneri* Rich.) fed on concentrate diet containing algal biomass 87

DANIELA BĂNĂŢEANU, HORST D. SCHELL, TRAIAN BENŢIA, RALUCA M. SCRIPCĂ-CRISTOF, Affinitätschromatographische Isolierung eines natürlichen Proteaseinhibitors aus der Weinbergschnecke *(Helix pomatia)* mittels an vernetzten Polyvinylalkohol fixierten α-Chymotrypsin 92

JEANA CIOPRAGA, OFELIA GOZIA, H. D. SCHELL, Katalytische Untersuchung der an Kollagenmembrane gebundenen Invertase 101

ELENA GANEA, MARIA ANDRAŞ, Human cathepsin B_1 degradation by trypsin. . 108

VL. GHEORDUNESCU, ANGELA ŞOAITĂ, The effect of toluene and other organic solvents on the Mg^{2+}-dependent ATPase activity from yeast 115

MARIA GREABU, Lysosomal acid phosphatase in the endotoxin shock. 124

IRINA ZAMFIRESCU, IOANA GOMOIU, OFELIA GOZIA, JEANA CIOPRAGA, HORST D. SCHELL, Auslese eines hochproduktiven *Aspergillus niger* Stammes zur Erzielung von Glukosoxidase zwecks Isolierung und Trägerfixierung des Enzyms an Kollagenmembrane 129

OFELIA GOZIA, JEANA CIOPRAGA, HORST D. SCHELL, Herstellung eines trägerfixierten Präparates der Glukosoxidase aus *Aspergillus niger* und seine katalytischen Eigenschaften (II) 135

IOANA HAGIMA, The relationships between aneuploidy and enzymatic polymorphism in wheat 141

MAGDALENA LUNGU, ANCA ROŞEANU, ELENA SĂSĂRMAN, ANA IONIŢĂ, ŞTEFANA JURCOANE, SILVIA HORIŢĂ, The activity of some enzymes in the lysine producing *Corynebacterium melassecola* cultivated in several medium conditions 145

M. A. MATEESCU, H. D. SCHELL, ELENA ENACHE, T. BENŢIA, TEODORA VÂLSĂNESCU, V. ZARCHIEVICI, CARMEN ROTARU, Amyloclastic method for the selective determination of α-amylase using insoluble CL-amylose and CL-starch tablets (preliminary note) 156

ERSILIA MUNTEANU, VICTORIA CIURDARU, CORNEL BODEA, Studies on steroid compounds in *Solanum laciniatum* Ait. and the tissue cultures of this plant 160

R. OLINESCU, T. GÎDOIU, T. SAFTA, S. NIŢĂ, S. A. HULEA, Biochemical mechanisms involved in the pharmacodynamic action of propolis. II. Changes following the administration of single and multiple doses. 166

HORST D. SCHELL, TEREZIA BENE, Vergleichende Untersuchung der katalytischen Eigenschaften der freien und der an vernetzten Polyvinylalkohol gebundenen-α-Amylase 173

M. TĂMAŞ, I. MARINESCU, On the contents of flavonoids in poplar buds 182

REVIEWS 186

St. cerc. biochim., 26, 2, 85—198 (1983)

ACTIVITATEA UNOR ENZIME DIGESTIVE LA PĂSTRĂVUL CURCUBEU (*SALMO GAIRDNERI* RICH.), FURAJAT CU HRANĂ CONCENTRATĂ CONȚINÎND FĂINĂ DE ALGE

* VLAD ARTENIE, ** COSTICĂ MISĂILĂ

Rezumat. S-a studiat dinamica activității α-amilazei și proteazelor digestive la păstrăvul curcubeu, în condițiile substituirii parțiale și totale a făinii de pește din hrana concentrată cu făină de alge.
Înlocuirea parțială (50%) a făinii de pește din hrana păstrăvului curcubeu cu făină de *Cladophora* sau cu făină de *Scenedesmus* determină stimularea activității specifice a α-amilazei și scăderea activității specifice a proteazelor în stomac, intestin și cecum piloric. Prin substituirea integrală a făinii de pește din hrana păstrăvului cu făină de alge, activitatea specifică a α-amilazei din stomac rămîne tot crescută comparativ cu valoarea de la loturile martor, enzima din intestin și cecum piloric fiind ușor inhibată. Activitatea specifică a proteazelor digestive diminuează într-o proporție practic neînsemnată.

Procesul digestiei la pești este asemănător cu cel de la animalele homeoterme terestre, prezentînd însă o serie de adaptări specifice habitatului organismelor poikiloterme.

Tractul digestiv al peștilor conține un spectru larg de hidrolaze (1), (2), (3), (4), care facilitează scindarea diferiților nutrienți și integrarea produșilor lor de descompunere în metabolismul celular și tisular. La diverse specii de pești, aceste enzime se diferențiază, în primul rînd prin nivelul activității lor catalitice. Păstrăvul curcubeu conține în tubul digestiv proteaze mai active decît enzimele corespunzătoare ale speciilor de pești ierbivori (2), (3), (5). Activitatea α-amilazei este mai mică la păstrăvul curcubeu decît la crap (2), (5), (6).

Datele referitoare la efectul hranei și al constituenților ei asupra biosintezei și activității principalelor hidrolaze implicate în digestia nutrienților la pești nu sînt prea numeroase în literatura de specialitate.

În prezenta lucrare se urmărește activitatea α-amilazei și proteazelor din tubul digestiv al păstrăvului curcubeu furajat cu hrană concentrată în care făina de pește s-a substituit parțial sau integral cu făină de alge.

MATERIAL ȘI METODE

Cercetările s-au efectuat pe loturi de păstrăv curcubeu (*Salmo gairdneri* Rich.) în vîrstă de un an, în condiții de creștere superintensivă, la Baza ecologică de acvacultură de la Potoci (lacul Izvorul Muntelui — Bicaz). Păstrăvii din loturile martor au fost hrăniți cu furajul concentrat Bicaz-Salmo I (7). La celelalte variante experimentale, făina de pește din compoziția

hranei concentrate s-a substituit în proporție de 50% și integral cu făină de alge din specii ale genurilor *Cladophora* și *Scenedesmus*, obținută de la Laboratorul de algologie al Stațiunii de cercetări „Stejarul" — Pîngărați (jud. Neamț).

Extracția enzimelor cercetate din stomac, intestin și cecum piloric s-a realizat prin mojararea țesutului respectiv, la rece, cu apă distilată în raport cu 1 g la 10 ml. Activitatea α-amilazei s-a determinat prin incubarea extractului enzimatic cu soluție de amidon 2% în tampon fosfat 0,01 M (pH 7), dozîndu-se maltoza scindată cu acid 3,5-dinitrosalicilic (8). Rezultatele s-au exprimat în unități amilazice, o unitate amilazică reprezentînd cantitatea de enzimă care catalizează formarea unui micromol maltoză/minut. Activitatea proteazelor s-a apreciat prin metoda Kunitz (9), folosindu-se ca substrat o soluție de cazeină 2% în tampon fosfat 0,1 M cu pH 7,6. Ca unitate proteazică s-a considerat cantitatea de enzimă care produce scindarea cazeinei în proporție echivalentă unui micromol tirozină/minut. Proteinele solubile în extractul enzimatic s-au dozat prin metoda Lowry și colab. (10). Activitatea specifică a enzimelor studiate s-a calculat în unități amilazice sau proteazice la mg proteină solubilă.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Cercetările noastre arată că, după 80 de zile (1.VIII—20.X.1978) de furajare a păstrăvului cu hrană conținînd 50% făină de *Cladophora* (10—15% proteină), activitatea specifică a α-amilazei crește în stomac cu 22,2%, în intestin cu 8,5% și în cecum piloric cu 78,5% (valoare semnificativă statistic) față de activitatea specifică a enzimei la lotul martor (tabela 1). Înlocuirea în aceeași proporție a făinii de pește cu

Tabela 1

Activitatea specifică a α-amilazei din tractul digestiv al păstrăvului curcubeu, furajat cu hrană conținînd făină de alge

Loturi studiate	Activitatea specifică a α-amilazei ($\bar{X} \pm$ ES *)					
	stomac		intestin		cecum piloric	
	20.X	20.XI	20.X	20.XI	20.X	20.XI
Lot martor *Cladophora*	0,256± 0,043	0,133± 0,013	0,396± 0,046	0,306± 0,043	0,343± 0,056	0,343± 0,026
Lot furajat cu hrană cu făină de *Cladophora*	0,313± 0,010 N.S.	0,163± 0,026 N.S.	0,430± 0,076 N.S.	0,280± 0,016 N.S.	0,613± 0,003 0,002<p<0,01	0,323± 0,026 N.S.
Lot furajat cu hrană cu făină de *Scenedesmus*	0,310± 0,010 N.S.	0,156± 0,020 N.S.	0,723± 0,086 p=0,05	0,270± 0,013 N.S.	0,763± 0,006 0,01<p<0,02	0,313± 0,076 N.S.
Lot martor *Scenedesmus*	0,273± 0,063	0,133± 0,013	0,416± 0,090	0,306± 0,043	0,520± 0,070	0,343± 0,026

* Media aritmetică ± eroarea standard pentru patru determinări paralele; N.S. = = nesemnificativ statistic; p = gradul de semnificație statistică.

făină de *Scenedesmus* (13—16% proteină) în hrana păstrăvului curcubeu induce după 50 de zile (1.IX—20.X.1978) stimularea activității α-amilazei atît în stomac (13,5%), cît și în intestin (73,8%) și cecum piloric (46,7%), însă numai ultimele două valori ating pragul de semnificație statistică (tabela 1). Dacă făina de pește din hrana păstrăvului este substituită integral cu făină de alge pentru o perioadă de 30 de zile (21.X—20.XI.1978), efectul de stimulare a activității α-amilazei nu se mai observă decît în

stomac și este comparabil cu cel din prima perioadă a testului. Activitatea specifică a α-amilazei din intestin și cecum piloric diminuează nesemnificativ statistic, în raport cu activitatea enzimei la peștii loturilor martor (tabela 1).

Încorporarea făinii de alge în hrana păstrăvului curcubeu determină în toate cele trei porțiuni ale tubului digestiv scăderea activității specifice a proteazelor comparativ cu activitatea aceloraşi enzime la loturile martor. Deşi inhibarea proteazelor din intestin este de aproximativ același ordin de mărime (23,9 % și, respectiv, 21,0 %) după înlocuirea făinii de pește din hrană cu 50 % și corespunzător cu 100 % făină de *Cladophora*, numai pentru concentrația minimă a acesteia se obține asigurarea statistică (tabela 2). Activitatea proteazelor din stomac și cecum piloric se micșorează nesemnificativ statistic sub influența făinii de *Cladophora* în hrană. Făina de *Scenedesmus* produce o anumită scădere a activității specifice a proteazelor, în special în stomac (21,1 %) și intestin (15,7 %), când substituie 50 % din făina de pește din hrană (tabela 2). Prin înlocuirea integrală

Tabela 2

Influența hranei cu făină de alge asupra activității specifice a proteazelor din tubul digestiv al păstrăvului curcubeu

Loturi studiate	Activitatea specifică a proteazelor ($\bar{X} \pm ES$)					
	stomac		intestin		cecum piloric	
	20.X	20.XI	20.X	20.XI	20.X	20.XI
Lot martor *Cladophora*	0,078± 0,036	0,035± 0,006	0,335± 0,013	0,248± 0,030	0,350± 0,020	0,280± 0,023
Lot furajat cu hrană cu făină de *Cladophora*	0,070± 0,015 N.S.	0,035± 0,003 N.S.	0,255± 0,018 0,01<p<0,02	0,196± 0,023 N.S.	0,312± 0,033 N.S.	0,253± 0,023 N.S.
Lot furajat cu hrană cu făină de *Scenedesmus*	0,075± 0,020 N.S.	0,032± 0,005 N.S.	0,322± 0,016 N.S.	0,212± 0,020 N.S.	0,322± 0,008 N.S.	0,275± 0,041 N.S.
Lot martor *Scenedesmus*	0,095± 0,028	0,035± 0,006	0,328± 0,046	0,248± 0,030	0,353± 0,015	0,280± 0,023

a făinii de pește cu făină de *Scenedesmus*, diminuarea activității proteazelor se menține la același nivel numai în intestin, în stomac și cecum piloric fiind neglijabilă.

Activarea α-amilazei digestive în urma substituirii făinii de pește din hrana păstrăvului cu 50 % făină de alge poate fi determinată de aportul sporit de poliglucide algale. Inhibarea activității α-amilazei, posibil și a proteazelor, s-ar putea datora unor metaboliți formați prin descompunerea substanțelor organice în timpul preparării făinurilor de alge (11). Acțiunea acestor inhibitori începe să se manifeste odată cu creșterea proporției preparatului algal în hrană, ceea ce are loc prin substituirea integrală a făinii de pește.

Rezultatele noastre relevă, de asemenea, faptul că activitatea enzimelor digestive reflectă într-o măsură apreciabilă comportamentul

alimentar al peștilor (2), (3), (5), (6), care sînt capabili să se adapteze la modificarea regimului alimentar între limite nestressante, ceea ce este foarte important în creșterea intensivă și în furajarea controlată a acestor organisme. Comparîndu-se activitatea α-amilazei și proteazelor din cele trei segmente ale tubului digestiv, se deduce că în intestin și cecum piloric enzimele studiate sînt mai active decît în stomac, constatare ce concordă cu alte cercetări (1), (5), (6).

CONCLUZII

1. Substituirea făinii de pește din hrana concentrată pentru furajarea păstrăvului curcubeu cu făină de *Cladophora* sau cu făină de *Scenedesmus* influențează diferențiat activitatea specifică a α-amilazei și proteazelor din stomac, intestin și cecum piloric.

2. Înlocuirea parțială (50%) a făinii de pește din hrană cu făină de alge determină stimularea activității specifice a α-amilazei și scăderea activității proteazelor în toate cele trei segmente ale tubului digestiv la păstrăvul curcubeu. Prezența făinii de *Cladophora* în hrană duce la activarea puternică a α-amilazei în cecum piloric și moderată în stomac. Sub acțiunea făinii de *Scenedesmus*, α-amilaza manifestă o activitate pronunțată în intestin și cecum piloric. Diminuarea activității proteazelor este semnificativă statistic numai la nivelul intestinului prelevat de la peștii furajați cu hrană concentrată conținînd făină de *Cladophora*.

3. Furajarea păstrăvului cu hrană în care făina de pește a fost substituită integral cu făină de alge produce modificări nesemnificative statistic ale activității enzimelor studiate.

Prezentat la redacție
la 12 iulie 1982

* *Universitatea „Al. I. Cuza" Iași,*
Disciplina de biochimie
și
** *Stațiunea de cercetări*
„Stejarul", Pîngărați, jud. Neamț

THE ACTIVITY OF SOME DIGESTIVE ENZYMES IN RAINBOW TROUT (*SALMO GAIRDNERI* RICH.) FED ON CONCENTRATE DIET CONTAINING ALGAL BIOMASS

SUMMARY

The dynamics of digestive α-amylase and protease activity in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) was studied under the conditions of partial or total substitution of fish meal from concentrate diet by algal biomass.

Partial substitution (50%) of fish meal from rainbow trout diet with *Cladophora* or *Scenedesmus* biomass determines a stimulation of α-amylase specific activity and a decrease of protease specific activity from the stomach, intestine and pyloric cecum.

After an integral replacement of fish meal with same vegetal biomass, the stomachal α-amylase specific activity remains always higher as compared with the control variants, the enzyme in the intestine and pyloric cecum being unsignificantly inhibited. In the same experimental conditions, the diminution of digestive protease specific activity was practically minor.

BIBLIOGRAFIE

1. F. NAGAYAMA, Y. SAITO, EIFAC Tech. Pap., **9**, 103 (1969).
2. M. KITAMIKADO, S. TACHINO, Nippon Suisan Gakkaishi, **26**, 679 (1960), rezumat în Chem. Abstr., **55**, 5789 a (1961).
3. M. KITAMIKADO, S. TACHINO, Nippon Suisan Gakkaishi, **26**, 685 (1960), rezumat în Chem. Abstr., **55**, 5789 b (1961).
4. M. KITAMIKADO, S. TACHINO, Nippon Suisan Gakkaishi, **26**, 691 (1960), rezumat în Chem. Abstr., **55**, 5789 c (1961).
5. VL. ARTENIE, MARIA APETROAIEI, K. BATTES, St. cerc. biochim., **25**, 131 (1982).
6. A. M. PHILLIPS, Jr., în *Fish Physiology*, sub red. W. S. HOAR, D. J. RONDALL, vol. I, Academic Press, New York—London, 1969, p. 391.
7. K. W. BATTES, C. MISĂILĂ, VL. ARTENIE, Brevet invenţie R. S. România nr. 68 344/1976.
8. G. NOELTING, P. BERNFELD, Helv. Chim. Acta, **31**, 286 (1948).
9. M. KUNITZ, J. Gen. Physiol., **30**, 291 (1947).
10. O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, R. J. RANDALL, J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951).
11. IU. A. KIRPENKO, L. A. SIRENKO, V. M. ORLOVSKII, L. F. LUKINA, *Toksin sinezelenih vodoroslei i organizm jivotnogo*, „Naukova Dumka", Kiev. 1977, p. 11.

IZOLAREA UNUI INHIBITOR NATURAL AL PROTEAZELOR DIN *HELIX POMATIA* PRIN CROMATOGRAFIE DE AFINITATE UTILIZÎND CA SUPORT AFIN α-CHIMOTRIPSINA IMOBILIZATĂ PE ALCOOL POLIVINILIC RETICULAT

DANIELA BĂNĂȚEANU, HORST D. SCHELL, TRAIAN BENȚIA, RALUCA M. SCRIPCĂ-CRISTOF

Rezumat. În lucrarea de față se prezintă izolarea unui inhibitor proteazic (I_1) din *Helix pomatia* prin cromatografie de afinitate pe α-chimotripsină (α-Cht) imobilizată pe alcool polivinilic reticulat, precum și efectul său asupra activității proteolitice și esterazice a α-Cht libere și imobilizate, în comparație cu un al doilea inhibitor proteazic (I_2), existent de asemenea în extractul din melc. Ambii inhibitori exercită o inhibiție competitivă asupra celor două tipuri de activități enzimatice atît în cazul α-Cht libere, cît și în cel al enzimei imobilizate. Activitatea proteolitică (substrat cazeină) este însă întotdeauna mai puternic inhibată decît cea esterazică (substrat ATEE și BTEE). Se constată totodată că prin imobilizare α-Cht devine mai stabilă față de acțiunea inhibitorilor și că inhibitorul cu greutate moleculară mai mare (I_2) are o acțiune mai slabă asupra enzimei imobilizate, datorată intervenției unor împiedicări sterice, decît inhibitorul cu greutate moleculară mai mică (I_1).

Inhibitorii naturali ai proteazelor sînt larg răspîndiți în regnul animal și vegetal (1)—(3). Pe lîngă rolul lor fiziologic important, o serie dintre ei prezintă și un interes deosebit pentru clinică în terapia diferitelor afecțiuni și stări de șoc. Pentru izolarea lor se folosește în ultimii ani tot mai des și cu mult succes cromatografia de afinitate, folosind ca suport afin proteaze imobilizate pe diferite suporturi insolubile.

În continuarea unor lucrări anterioare, în care sînt descrise izolarea aproteninei (Trasylol®) prin cromatografie de afinitate pe kalicreină imobilizată (4) și izolarea inhibitorilor proteazelor din tuberculi de cartof (5) și făină de soia (6) pe α-Cht imobilizată pe agaroză activată cu BrCN, în lucrarea de față prezentăm separarea prin cromatografie de afinitate pe α-Cht imobilizată pe alcool polivinilic reticulat a unui inhibitor al proteazelor (I_1) dintr-un extract de melc *(Helix pomatia)*, precum și rezultatele obținute în studiul comparativ al acțiunii sale asupra activității proteolitice și esterazice a α-Cht libere și imobilizate. În lucrarea noastră am ținut seama de indicațiile date de Tschesche și Dietl (7), care au izolat acest inhibitor pe tripsină imobilizată pe o rășină nedefinită mai precis. În extractul brut de melc există și un al doilea inhibitor al proteazelor (I_2), care rămîne în supernatant după precipitarea inhibitorului I_1 cu sulfat de amoniu și care, după autorii citați, se deosebește de primul prin termostabilitate și prin greutate moleculară mai ridicată.

St. cerc. biochim., 26, 2, 92—100 (1983)

Prezentăm în continuare studiul comparativ al acțiunii celor doi inhibitori asupra activității proteazice și esterazice a α-Cht libere și imobilizate.

MATERIAL ȘI METODE

Pentru obținerea suportului afin necesar izolării inhibitorilor proteici dintr-un extract brut de *Helix pomatia* prin cromatografie de afinitate, s-au imobilizat 15 mg α-Cht liofilizată (Biofarm, București) pe 20 ml gel perlat de alcool polivinilic reticulat cu epiclorhidrină (8) și activat cu BrCN (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, R. F. Germania), după indicațiile date de Axén și Ernback (9). α-Cht astfel imobilizată a servit și la studiul acțiunii inhibitorilor izolați din melc asupra activității proteolitice și esterazice a enzimei imobilizate, în comparație cu cea liberă. Activitatea proteolitică a fost determinată după metoda Kunitz (10), modificată de Rick (11), folosind ca substrat cazeină preparată de noi după metoda Hammersten (12) și adăugînd în reacție 0,1 ml soluție de enzimă liberă (0,016 mg α-Cht/probă) sau 0,05 ml gel enzimatic (0,02 mg α-Cht imobilizată/probă). Pentru determinarea activității esterazice s-au folosit două substraturi sintetice, și anume N-benzoil-L-tirozin-etil-ester (BTEE) și N-acetil-L-tirozin-etil-ester (ATEE) , metoda de determinare în cazul primului substrat fiind cea indicată de Hummel (13), iar în cazul ATEE cea indicată de Schwert și Takenaka (14).

La urmărirea efectului inhibitorilor izolați asupra activității proteazice și esterazice a α-Cht libere și imobilizate s-au folosit în mediul de reacție cantități crescînde de inhibitor, cuprinse între 0 și 100 μg. Constantele de inhibiție (K_I) ale inhibitorilor izolați au fost determinate după metoda grafică a lui Dixon (15), urmărindu-se activitatea proteolitică și esterazică a enzimei libere și legate și la o a doua concentrație de substrat (S_2), care corespundea la jumătate din cantitatea substratului folosit în prima serie de determinări.

Extractul din *Helix pomatia* a fost obținut, după Tschesche și Dietl (7), prin omogenizarea a 64 g melci congelați, eliberați de cochilii, în 128 ml apă distilată, răcită cu gheață. După un repaus de o oră la rece, omogenatul a fost centrifugat 30 min la 5 000 rotații/min. Prin adăugarea de sulfat de amoniu solid în supernatantul obținut după centrifugare pînă la o saturație de 63 %, la 4°C (444 g $(NH_4)_2SO_4$/l) se obține un precipitat care conține inhibitorul (I_1) cu greutate moleculară mai mică și care va fi separat prin cromatografie de afinitate după dizolvarea precipitatului în 93 ml apă (conținut proteic 14,6 mg/ml). În acest scop se aplică 3 ml din soluția obținută pe o coloană cromatografică cu un pat de gel de 0,8 × 7 cm (3,5 ml α-Cht imobilizată), conexată la un colector automat de fracțiuni cu înregistrare grafică a extincției la 280 nm (LKB Suedia), culegînd probe de cîte 2 ml la o viteză de curgere de 30 ml/oră. După trecerea completă a proteinelor nereținute de suportul afin se schimbă tamponul de lucru (Tris-HCl 0,2 M, pH 7,6) cu un eluant format dintr-o soluție de KCl 0,5 M în HCl 0,1 N (pH 1,7), care eluează inhibitorul reținut prin adsorbție bioselectivă de α-Cht imobilizată din coloană.

În supernatantul rămas după precipitarea cu $(NH_4)_2SO_4$ se află un al doilea inhibitor (I_2), cu o greutate moleculară mai mare, care a fost studiat după o prealabilă dializă (concentrația proteică finală 4,9 mg/ml).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Prin legarea covalentă a α-Cht de un gel perlat de alcool polivinilic reticulat cu epiclorhidrină și activat cu BrCN, s-a obținut un preparat enzimatic activ cu un conținut proteic de 0,4 mg/ml gel și o activitate proteolitică reziduală de 50 % (substrat cazeină). Activitatea esterazică reziduală este de 52 % în cazul substratului BTEE, respectiv de 63 % la folosirea de ATEE drept substrat. Datorită proprietăților sale mecanice și catalitice remarcabile, preparatul imobilizat al α-Cht prezintă un suport afin ideal pentru separarea rapidă și într-un înalt grad de puritate a inhibitorilor naturali ai proteazelor prin cromatografie de afinitate din diferite surse biologice.

Din figura 1 rezultă eficiența suportului afin în separarea unui inhibitor natural al proteazelor dintr-un extract brut de *Helix pomatia*, precipitat în prealabil cu sulfat de amoniu și redizolvat apoi într-un volum minim de apă, după indicațiile date de Tschesche și Dietl (7). Cantitatea totală de inhibitor reținut de coloana cromatografică (3,5 ml

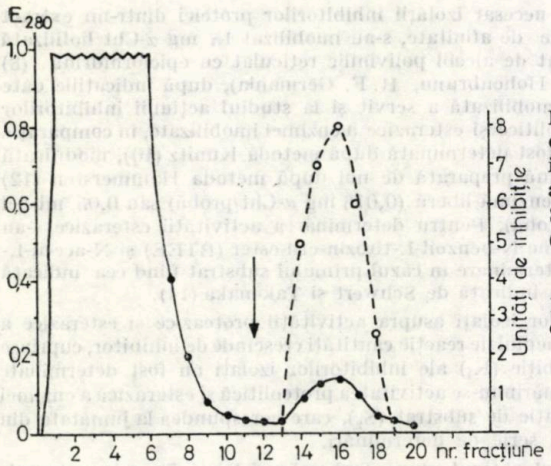


Fig. 1. — Diagrama de separare prin cromatografie de afinitate pe α-Cht imobilizată pe alcool polivinilic reticulat a inhibitorului proteazic din *Helix pomatia*. Săgeata indică aplicarea eluantului (KCl 0,5 M în HCl 0,1 N).
● ——— ● extincție la 280 nm
o - - - - o acțiunea inhibitoare a fracțiunilor eluate de pe coloană asupra activității esterazice (substrat BTEE) a α-Cht.

suport afin) prin aplicarea a 3 ml probă era de 3,7 mg proteină, adică de 1,05 mg/ml gel. Această valoare este superioară celor obținute de noi la separarea unui inhibitor natural al α-Cht din tuberculi de cartof (0,35 mg proteină/ml gel) pe un suport afin realizat prin cuplarea α-Cht de un gel perlat de agaroză reticulată și activată cu BrCN (5) sau din făină de soia (0,82 mg proteină/ml gel afin) (6).

Autorii citați (7) au izolat acest inhibitor (I_1) pe un preparat de tripsină imobilizată și au constatat că ar fi format, de fapt, din mai mulți izoinhibitori cu greutate moleculară mică (circa 6500), cu o specificitate de acțiune largă, inhibînd activitatea unei serii de proteaze (tripsină, α-Cht, plasmină și kalicreină organică), spre deosebire de un al doilea inhibitor (I_2), rămas în supernatant după tratarea extractului de melc cu sulfat de amoniu, avînd greutate moleculară mai mare și specificitate mai restrînsă (nu acționează asupra kalicreinei).

În continuare prezentăm datele obținute la studierea acțiunii acestor doi inhibitori asupra activității proteolitice și esterazice a α-Cht libere *și* imobilizate.

În figura 2 se prezintă acțiunea unor cantități crescînde ale inhibitorului I_1 asupra activității proteolitice a α-Cht libere și legate, constatîndu-se o scădere pronunțată a activității catalitice a enzimei libere cu creșterea cantității inhibitorului în mediul de reacție. Din figură rezultă totodată că enzima imobilizată este mai puțin sensibilă la acțiunea inhibitorului I_1, prezentînd, de pildă, la o cantitate de 100 μg inhibitor în probă încă 74% din activitatea ei inițială, spre deosebire de enzima liberă, care în aceste condiții își mai păstrează doar un rest de 16% din activitatea

inițială în absența inhibitorului. Această comportare se reflectă și în valorile constantelor de inhibiție obținute pentru acest inhibitor în cazul α-Cht libere ($K_i = 7{,}5 \cdot 10^{-3}$ g/l) (fig. 3) și al celei imobilizate ($K_i' = 15 \cdot 10^{-3}$ g/l) (fig. 4) (tabela 1).

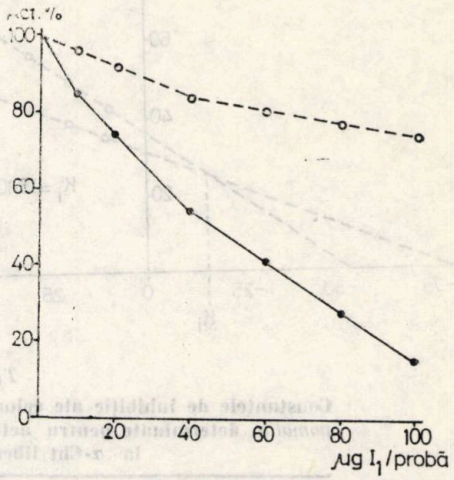


Fig. 2. — Variația activității proteolitice (substrat cazeină) a α-Cht libere (● ——— ●) și imobilizate (o - - - - o) în prezența unor cantități crescînde de I_1.

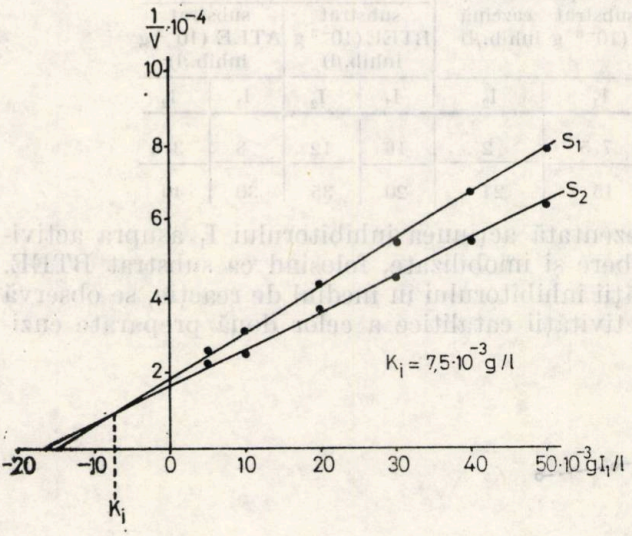


Fig. 3. — Determinarea grafică a K_i pentru I_1 în cazul α-Cht libere (substrat cazeină).

Din reprezentările grafice alcătuite în vederea determinării constantelor de inhibiție după metoda Dixon și redate în lucrare, din motive de spațiu, numai în cazul particular al acțiunii I_1 asupra activității proteolitice (fig. 3 și 4), rezultă totodată că acțiunea celor doi inhibitori este de tip competitiv atît în cazul activității proteolitice, cît și în cel al activității esterazice a α-Cht libere și imobilizate.

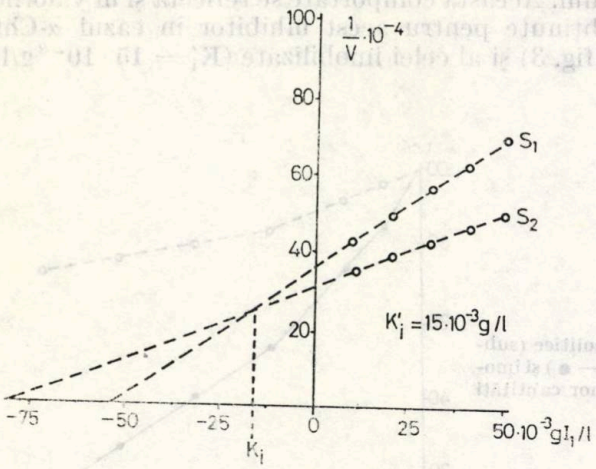


Fig. 4. — Determinarea grafică a K_i pentru I_2 în cazul α-Cht imobilizate (substrat cazeină).

Tabela 1

Constantele de inhibiție ale celor doi inhibitori izolați din *Helix pomatia*, determinate pentru activitatea proteolitică și esterazică la α-Cht liberă și imobilizată

Preparatul enzimatic folosit	K_i pentru activitatea proteolitică, substrat cazeină (10^{-3} g inhib./l)		K_i pentru activitatea esterazică			
			substrat BTEE (10^{-3} g inhib./l)		substrat ATEE (10^{-3} g inhib./l)	
	I_1	I_2	I_1	I_2	I_1	I_2
α-Cht liberă	7,5	2	16	12	8	3,5
α-Cht legată	15	24	20	35	30	40

În figura 5 este prezentată acțiunea inhibitorului I_1 asupra activității esterazice a α-Cht libere și imobilizate, folosind ca substrat BTEE. Odată cu creșterea cantității inhibitorului în mediul de reacție, se observă o scădere progresivă a activității catalitice a celor două preparate enzi-

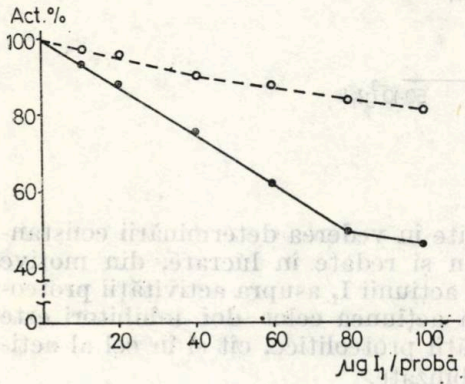


Fig. 5. — Variația activității esterazice (substrat BTEE) a α-Cht libere (● ——— ●) și imobilizate (o - - - - o) în prezența unei cantități crescînde de I_1.

matice, care este însă mai puțin pronunțată decît în cazul activității proteolitice. Astfel, în timp ce enzima liberă mai păstrează în prezența a 100 μg I_1 în mediul de reacție încă o activitate esterazică de 47 %, activitatea ei proteolitică în aceste condiții este de numai 16 %. Se constată totodată că, și în cazul activității esterazice (substrat BTEE), enzima legată este mai puțin afectată de concentrații crescînde de inhibitor. Aceste constatări se reflectă foarte bine și în valorile K_i determinate atît în cazul enzimei libere, cît și în cel al enzimei imobilizate, valorile fiind de $16 \cdot 10^{-3}$ g I_1/l, respectiv de $20 \cdot 10^{-3}$ g I_1/l (tabela 1).

O comportare oarecum similară a α-Cht libere și imobilizate față de I_1 se observă și la folosirea substratului ATEE (fig. 6), enzima imobilizată prezentînd însă o valoare K_i' și mai crescută.

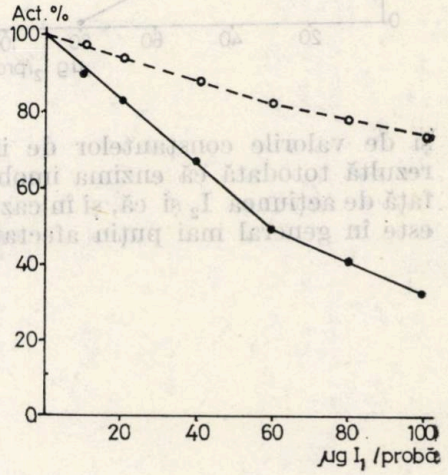


Fig. 6. – Variația activității esterazice (substrat ATEE) a α-Cht libere (● ——— ●) și imobilizate (o - - - - o) în prezența unei cantități crescînde de I_1.

În continuare, se prezintă rezultatele obținute în cazul testării activității proteolitice și esterazice a celor două preparate enzimatice și în prezența inhibitorului I_2, cu greutate moleculară mai mare. Astfel, urmărind variația activității proteolitice a α-Cht libere și legate în prezența unor cantități crescînde ale inhibitorului I_2 în mediul de reacție (fig. 7), se constată o scădere mult mai accentuată a activității catalitice comparativ cu inhibitorul I_1. Se poate observa că, în prezența a 80 μg I_2 în mediul de reacție, activitatea catalitică a α-Cht libere este de numai 2 %, în timp ce aceeași cantitate din inhibitorul I_1 produce o scădere a acestei activități doar de 27 %. La enzima legată, deosebirea față de I_1 nu este atît de pronunțată. Calculînd constantele de inhibiție respective, se observă că prin imobilizare α-Cht devine de 12 ori mai rezistentă față de inhibitorul I_2 (tabela 1), ceea ce se poate explica prin faptul că I_2, avînd o greutate moleculară mai mare, întîmpină anumite împiedicări sterice în acțiunea sa asupra enzimei imobilizate pe suportul insolubil.

Activitatea esterazică a α-Cht libere determinată pe substratul BTEE (fig. 8) este de asemenea mai mult afectată în prezența inhibitorului I_2, în comparație cu I_1, în cazul aceluiași substrat, fapt demonstrat

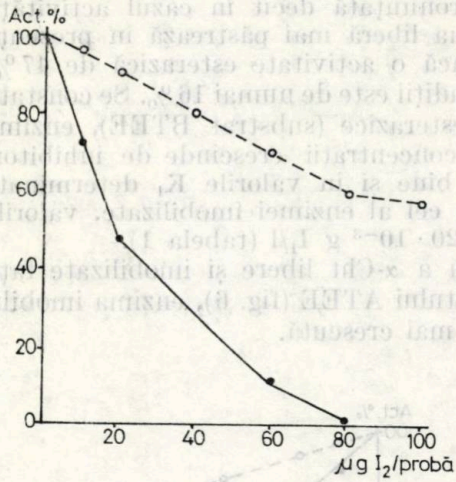


Fig. 7. — Variația activității proteolitice (substrat cazeină) a α-Cht libere (● ——— ●) și imobilizate (o - - - - o) în prezența unei cantități crescinde de I_2.

și de valorile constantelor de inhibiție respective (tabela 1), din care rezultă totodată că enzima imobilizată devine de trei ori mai rezistentă față de acțiunea I_2 și că, și în cazul acestui inhibitor, activitatea esterazică este în general mai puțin afectată decît cea protează.

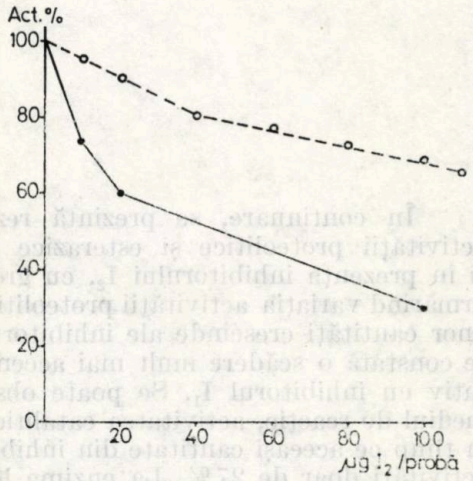


Fig. 8. — Variația activității esterazice (substrat BTEE) a α-Cht libere (● ——— ●) și imobilizate (o - - - - o) în prezența unei cantități crescinde de I_2.

În sfîrșit, determinînd activitatea esterazică și pe substratul ATEE (fig. 9), se observă că, și în cazul inhibitorului I_2, această activitate este mai puțin afectată decît activitatea proteolitică la ambele forme de enzimă (tabela 1). Se constată că, în cazul utilizării acestui substrat, enzima legată prezintă o valoare K_i' de peste 10 ori mai mare față de enzima liberă, deci apariția unei rezistențe considerabile ca urmare a legării enzimei de suportul insolubil.

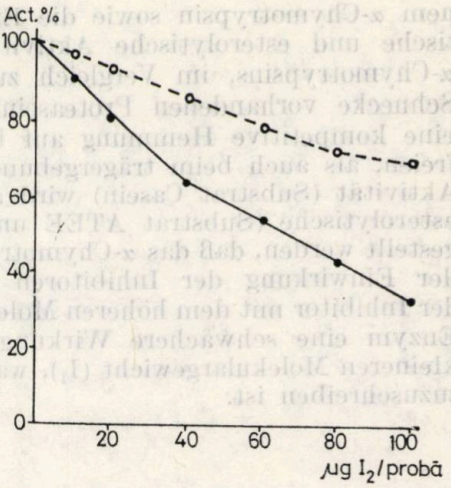


Fig. 9. — Variația activității esterazice (substrat ATEE) a α-Cht libere (● ——— ●) și imobilizate (o - - - - o) în prezența unei cantități crescînde de I_2.

CONCLUZII

1. S-a separat, într-o singură fază de lucru, prin cromatografie de afinitate pe un suport afin format din α-Cht imobilizată pe alcool polivinilic reticulat, un inhibitor natural al α-Cht din extract brut de melc, cu greutate moleculară mică (I_1).

2. Din același extract brut s-a separat și un al doilea inhibitor al α-Cht, inhibitor ce are o masă moleculară mare (I_2).

3. Ambii inhibitori exercită o acțiune de inhibiție competitivă atît asupra activității proteolitice pe substrat cazeină, cît și asupra activității esterazice, pe substraturi sintetice ATEE și BTEE, a α-Cht libere și imobilizate.

4. Activitatea proteolitică este mai puternic inhibată decît cea esterazică la ambele forme de enzimă.

5. Prin imobilizare, α-Cht devine mai rezistentă față de acțiunea inhibitorilor studiați atît în ceea ce privește activitatea ei proteolitică, cît și cea esterazică, rezistența fiind mai mare față de acțiunea inhibitorului I_2, care are greutate moleculară mare, datorită apariției unor împiedicări sterice.

Prezentat la redacție
la 31 mai 1983

Institutul de științe biologice
București, Splaiul Independenței nr. 296

AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHISCHE ISOLIERUNG EINES NATÜRLICHEN PROTEASEINHIBITORS AUS DER WEINBERGSCHNECKE (*HELIX POMATIA*) MITTELS AN VERNETZTEN POLYVINYLALKOHOL FIXIERTEN α-CHYMOTRYPSIN

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit beschreiben wir die Isolierung eines Proteaseinhibitors (I_1) aus der Weinbergschnecke (*Helix pomatia*) durch Affinitätschromatographie mit an vernetzten Polyvinylalkohol gebunde-

nem α-Chymotrypsin sowie die Einwirkung desselben auf die proteolytische und esterolytische Aktivität des freien und trägergebundenen α-Chymotrypsins, im Vergleich zu einem zweiten, im Rohextrakt der Schnecke vorhandenen Proteaseinhibitors (I_2). Beide Inhibitoren üben eine kompetitive Hemmung auf beide Enzymaktivitäten, sowohl beim freien, als auch beim trägergebundenen Enzym aus. Die proteolytische Aktivität (Substrat Casein) wird aber immer stärker gehemmt, als die esterolytische (Substrat ATEE und BTEE). Es konnte weiterhin festgestellt werden, daß das α-Chymotrypsin durch Trägerfixierung gegenüber der Einwirkung der Inhibitoren an Beständigkeit gewinnt, und daß der Inhibitor mit dem höheren Molekulargewicht (I_2) auf das trägerfixierte Enzym eine schwächere Wirkung ausübt, als der Inhibitor mit dem kleineren Molekulargewicht (I_1), was dem Auftreten sterischer Hinderung zuzuschreiben ist.

BIBLIOGRAFIE

1. R. VOGEL, I. TRAUTSCHOLD, E. WERLE, *Natural Proteinase Inhibitors*, Academic Press, New York, 1968.
2. M. LASKOVSKI, Jr., R. W. SEALOCK, in *The Enzymes*, sub red. P. D. BOYER, Academic Press, New York, 1971, p. 375.
3. H. FRITZ, H. TSCHESCHE, Proc. Int. Res. Conf. *Proteinase Inhibitors*, Walter de Gruyter, Berlin, 1971.
4. H. D. SCHELL, M. ARSENE, Rev. roum. Biochim., **19**, 63 (1982).
5. H. D. SCHELL, D. BĂNĂŢEANU, A. WAHEED, St. cerc. biochim., **24**, 181 (1981).
6. D. BĂNĂŢEANU, H. D. SCHELL, A. WAHEED, St. cerc. biochim., **24**, 135 (1981).
7. H. TSCHESCHE, T. DIETL, Eur. J. Biochem., **30**, 560 (1972).
8. H. D. SCHELL, M. A. MATEESCU, M. DIMONIE, C. V. OPRESCU, T. BENŢIA, Brevet românesc nr. 74486/1980.
9. R. AXÉN, S. ERNBACK, Eur. J. Biochem., **18**, 351 (1971).
10. M. KUNITZ, J. Gen. Physiol., **30**, 191 (1947), in *Methods in Enzymology*, sub red. S. P. COLOWICK, N. O. KAPLAN, Academic Press, New York, 1955, p. 13.
11. W. RICK, in *Methods of Enzymatic Analysis*, sub red. M. V. BERGMEYER, Academic Press, New York, 1965, p. 800.
12. O. HAMMERSTEN, *Textbook of Physiological Chemistry*, J. Wiley and Sons, New York, 1900.
13. P. C. W. HUMMEL, Canad. J. Biochem. Physiol., **37**, 1393 (1959).
14. G. W. SCHWERT, Y. TAKENAKA, Biochim. Biophys. Acta, **16**, 180 (1955).
15. M. DIXON, Biochem. J., **55**, 161 (1953).

STUDIUL CATALITIC AL INVERTAZEI IMOBILIZATE PE MEMBRANĂ DE COLAGEN

JEANA CIOPRAGA, OFELIA GOZIA, H. D. SCHELL

Rezumat. Imobilizarea invertazei s-a realizat prin legarea ei covalentă pe o membrană de colagen, în prezența unei carbodiimide solubile (EDC), obținîndu-se un preparat enzimatic cu un conținut proteic de 0,22 mg/cm² și cu o activitate reziduală de 21 %. Prin imobilizare, invertaza a căpătat o rezistență crescută față de valori de pH situate deasupra pH-ului optim, față de temperatură și față de acțiunea unor inhibitori (ioni metalici) prezenți în mediu. Enzima în stare insolubilă a fost folosită de repetate ori, fără ca activitatea ei enzimatică să fie afectată.

Invertaza (EC 3.2.1.26) catalizează reacția de hidroliză generală:

$$\beta\text{-D-fructofuranozid} + H_2O \rightarrow \text{alcool} + \text{D-fructoză}$$

În particular, această enzimă scindează hidrolitic zaharoza după reacția:

$$\text{zaharoză} + H_2O \rightarrow \underbrace{\text{glucoză} + \text{fructoză}}_{\text{zahăr invertit}},$$

reacție denumită „invertirea zahărului".

Studiul acestei enzime în stare imobilizată prezintă interes mai ales datorită perspectivelor ei de aplicare în practică la obținerea zahărului invertit într-un sistem de funcționare continuă. Acest fapt este ilustrat și de numeroase studii care descriu diferite preparate de invertază imobilizată, obținute însă pe alte căi și pe alte suporturi, cum ar fi: preparate de invertază imobilizată prin legare covalentă pe fibre de triacetat de celuloză (1), (2) sau pe agaroză activată cu BrCN (3), prin copolimerizare cu acid metacrilic (4), dimetilacrilamidă și alcool polivinilic (5), (6), prin adsorbție pe DEAE-celuloză (7) sau prin imobilizare pe particule magnetice de oxid de fier (8).

În lucrarea de față descriem proprietățile unui preparat de invertază imobilizată pe membrană de colagen.

MATERIAL ȘI METODE

În studiile noastre am folosit o invertază cristalină (Serva, Heidelberg) din drojdie de bere, iar ca suport o membrană de colagen. Pentru obținerea preparatului enzimatic insolubil, membrana de colagen, îmbibată în prealabil cu o soluție de NaOH 0,1 N și spălată cu apă distilată pînă la pH neutru, s-a tratat cu 20 ml soluție enzimatică conținînd 200 mg invertază cristalină și 100 mg clorhidrat de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimidă (EDC).

Determinarea activității invertazei libere, nelegate s-a făcut, după metoda Noelting și Bernfeld (9), prin dozarea glucozei eliberate în urma acțiunii hidrolitice a enzimei asupra unei

soluţii de zaharoză. Amestecul de reacţie, format din zaharoză 0,25 M, soluţie enzimatică (1 mg/ml) şi tampon acid acetic-acetat de sodiu 0,02 M, pH 4,5, a fost incubat 15 min la 37°C, după care reacţia s-a stopat prin adăugarea reactivului 3,5-dinitrosalicilic. După stopare, probele s-au fiert 5 min pe baie de apă, s-au răcit şi fiecare probă s-a diluat la 10 ml cu apă distilată, colorimetrîndu-se la 540 nm faţă de martor. Densităţile optice obţinute se transformă în nmoli zahăr invertit cu ajutorul unei curbe etalon, construită cu o soluţie de zahăr invertit 0,0025 M.

Activitatea specifică a fost exprimată în nmoli zahăr invertit/min/mg proteină la 37°C.

Determinarea activităţii invertazei imobilizate s-a făcut în aceleaşi condiţii ca la enzima liberă, folosindu-se însă o bucată de 0,25 cm^2 de membrană enzimatică activă, care la sfîrşitul reacţiei a fost îndepărtată din mediul de reacţie înaintea adăugării reactivului dinitrosalicilic.

Determinarea influenţei pH-ului asupra activităţii enzimei libere şi imobilizate s-a efectuat urmărindu-se reacţia enzimatică la următoarele valori de pH : 3,5 ; 4,0 ; 4,5 ; 5,0 ; 5,5 ; 6,0 şi 6,5.

Efectul temperaturii asupra activităţii catalitice a celor două preparate enzimatice a fost urmărit efectuîndu-se reacţia enzimatică la temperaturi de 5, 15, 25, 37, 45, 55, 65 şi 75°C.

Influenţa concentraţiei de substrat asupra activităţii enzimatice a fost determinată utilizîndu-se următoarele concentraţii de zaharoză : 0,01, 0,015, 0,025, 0,05, 0,1, 0,125, 0,15, 0,2, 0,25, 0,375, 0,5 M.

Efectul ionilor metalici asupra activităţii invertazei libere şi imobilizate s-a studiat urmărindu-se reacţia enzimatică în prezenţa ionilor de Pb, Zn, Cu, Ni, sub formă de acetaţi, şi a ionului de Ag, sub formă de sulfat. Concentraţiile de ioni utilizate au fost alese în aşa fel încît să poată fi dovedit un efect semnificativ asupra enzimei (activare sau inhibiţie) şi totodată să se evite apariţia de precipitate ale hidroxizilor ionilor studiaţi. Astfel, cantităţile de ioni prezente în mediul de reacţie au fost de 0,375, 0,75, 1,5, 3,75 şi 15 μmoli pentru Pb^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}, de 3,75, 7,5, 15, 30, 45 şi 60 μmoli pentru Ni^{2+} şi de 0,0375, 0,075, 0,15, 0,30, 0,75 şi 1,5 μmoli pentru Ag^{+}.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Prin imobilizarea invertazei pe membrană de colagen s-a obţinut un preparat enzimatic cu un conţinut proteic de 0,22 mg proteină/cm^2 şi cu o activitate reziduală de 21%.

Unul din aspectele urmărite de noi în lucrarea de faţă a fost stabilirea pH-ului optim atît pentru enzima liberă, cît şi pentru cea imobilizată.

Din figura 1 se poate observa că pH-ul optim al invertazei libere este situat în domeniul de pH 4,5—5,0, ceea ce concordă cu valoarea

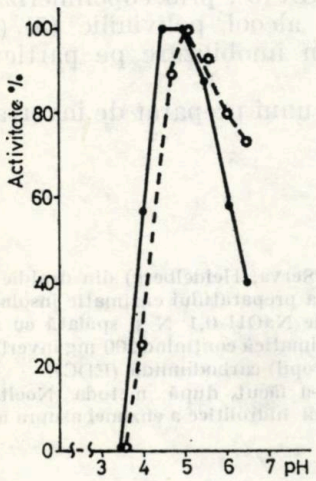


Fig. 1. — Variaţia activităţii invertazei libere (●———●) şi imobilizate (o- - - -o) în funcţie de pH.

de pH optim al invertazei indicat în literatura de specialitate (9), iar cel al enzimei imobilizate este situat tot în acest interval (pH 5,0). Totodată se constată că, la valori de pH situate sub valoarea pH-ului optim, enzima imobilizată este mai sensibilă, fiind însă mai stabilă la valorile de pH superioare celui optim. De exemplu, la pH 6,0, în timp ce enzima liberă mai păstrează doar 58 % din activitate, enzima imobilizată menține încă 80 % din activitatea prezentată la pH optim, fapt ce s-a repetat și la pH 6,5, unde enzimei imobilizate i-au revenit 74 % din activitate, iar celei libere doar 40 %.

Una din explicațiile rezistenței mai crescute a enzimei imobilizate la aceste valori de pH situate în jurul pH-ului neutru ar putea fi efectul stabilizator exercitat asupra enzimei de natura proteică a suportului, precum și de sarcina electrică aproximativ neutră a acestuia.

Efectul temperaturii de reacție asupra activității catalitice a celor două preparate enzimatice este redat în figura 2.

Atît enzima liberă, cît și cea imobilizată prezintă aceeași temperatură optimă de activitate (55°C). După cum se observă din figură, la temperaturi situate peste 55°C, enzima imobilizată s-a dovedit a fi mai rezistentă, în ciuda faptului că la aceste temperaturi suportul proteic își micșorează într-o oarecare măsură suprafața, contractîndu-se sub influența efectului termic. Astfel, la 65°C, enzima imobilizată a păstrat

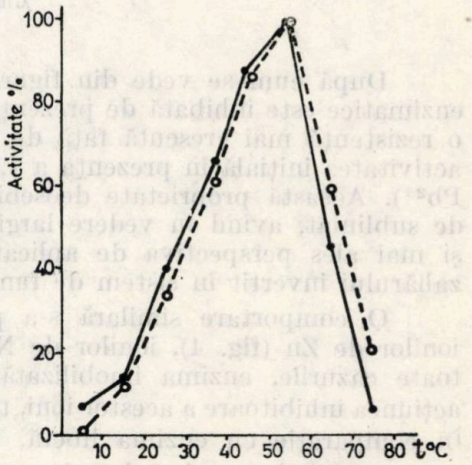


Fig. 2. — Variația activității invertazei libere (●———●) și imobilizate (o----o) în funcție de temperatura de reacție.

încă 60 % din activitatea optimă față de 45 %, cît a prezentat enzima liberă la această temperatură, iar la 75°C, cînd enzima imobilizată mai păstrează 22 % din activitate, cea liberă prezintă doar un rest de activitate de 6 %.

Urmărindu-se influența concentrației de substrat asupra vitezelor de reacție ale invertazei libere și imobilizate, s-a constatat o comportare asemănătoare, cele două preparate enzimatice prezentînd o curbă tipic Michaelis-Menten. Utilizînd reprezentarea Lineweaver-Burk, s-au obținut valori ale constantelor Michaelis (K_m) de 142,8 mM la enzima liberă și

de 125 mM la enzima imobilizată. Scăderea valorii K_m în urma imobilizării a fost semnalată în literatură şi de alţi autori (10).

În lucrarea de faţă am studiat şi efectul Pb^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}, Ni^{2+} sub formă de acetaţi şi al Ag^{+} sub formă de sulfat, ioni care ar putea apărea eventual în mediul de reacţie din instalaţiile industriale, în reactoare enzimatice.

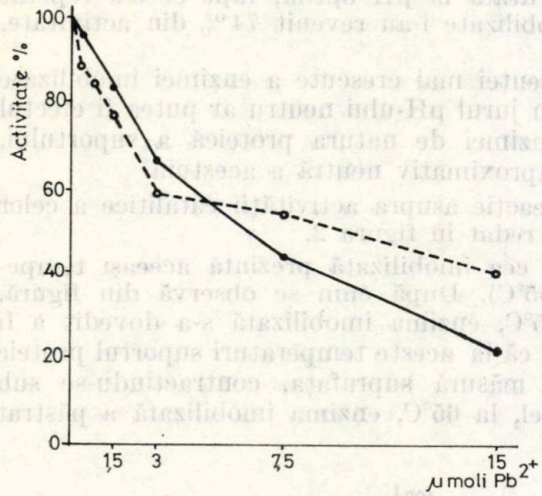


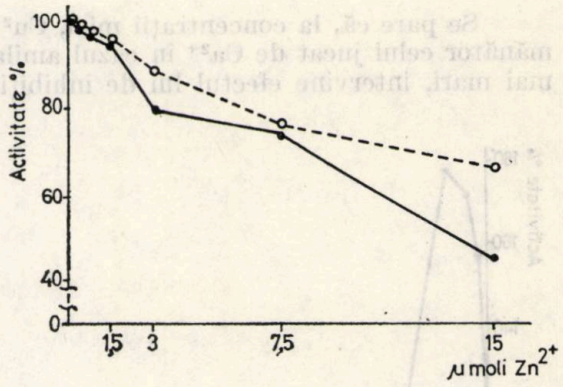
Fig. 3. — Efectul ionilor de plumb asupra activităţii invertazei libere (●———●) şi imobilizate (o- - - -o).

După cum se vede din figura 3, activitatea celor două preparate enzimatice este inhibată de prezenţa Pb^{2+}, enzima imobilizată prezentînd o rezistenţă mai crescută faţă de acest ion (ea mai păstrează 55 % din activitatea iniţială în prezenţa a 7,5 μmoli Pb^{2+} şi 40 % faţă de 15 μmoli Pb^{2+}). Această proprietate deosebită a enzimei imobilizate este demnă de subliniat, avînd în vedere largile utilizări ale invertazei în industrie şi mai ales perspectiva de aplicare practică a invertazei în obţinerea zahărului invertit în sistem de funcţionare continuă.

O comportare similară s-a putut constata şi în cazul prezenţei ionilor de Zn (fig. 4), ionilor de Ni (fig. 5) şi ionilor de Ag (fig. 6). În toate cazurile, enzima imobilizată s-a dovedit mai rezistentă faţă de acţiunea inhibitoare a acestor ioni, toţi cu rol de blocare a grupărilor —SH, în comparaţie cu enzima liberă.

Studiindu-se efectul Cu^{2+} asupra celor două preparate enzimatice, s-a observat o comportare deosebit de interesantă (fig. 7). Astfel, în timp ce în domeniul de concentraţii cuprins între 0,375 şi 1,5 μmoli Cu^{2+} în mediul de reacţie activitatea enzimei libere creşte cu 75 %, în continuare, pe măsura creşterii cantităţii de Cu^{2+}, activitatea catalitică scade brusc, fiind nulă la o concentraţie de 15 μmoli Cu^{2+} în mediu. Deşi enzima imobilizată este activată mai puţin (numai cu 20 % în prezenţa a 1 μmol Cu^{2+}), la concentraţii mai mari de Cu^{2+} în mediu ea este mai puţin afectată, păstrînd încă 39 % din activitatea iniţială la 15 μmoli Cu^{2+} în mediul de reacţie.

Fig. 4. — Efectul ionilor de zinc asupra activității invertazei libere (●——●) și imobilizate (o- - - -o).



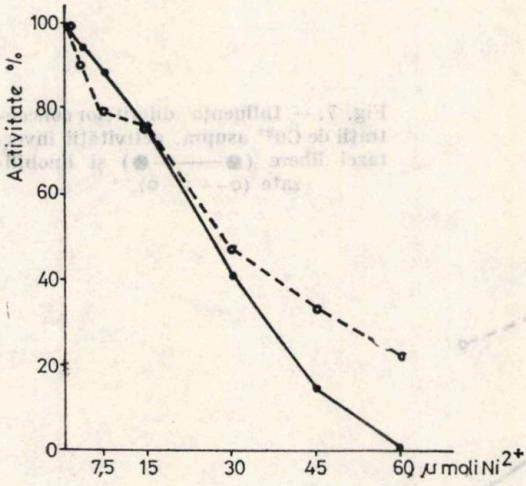


Fig. 5. —Efectul ionilor de nichel asupra activității invertazei libere (●——●) și imobilizate (o- - - -o).

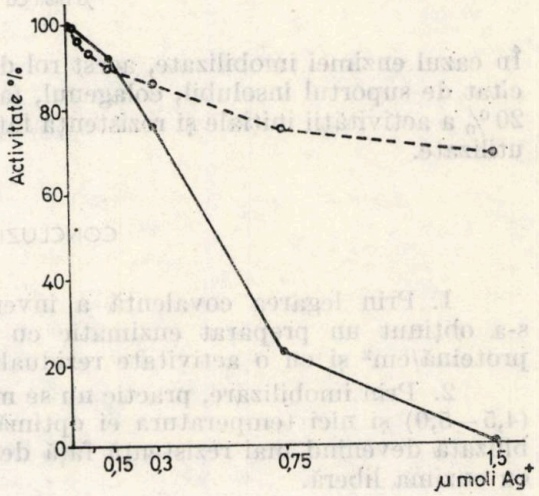


Fig. 6. — Efectul ionilor de argint asupra activității invertazei libere (●——●) și imobilizate (o- - - -o).

Se pare că, la concentrații mici, Cu^{2+} joacă un rol stabilizator (asemănător celui jucat de Ca^{2+} în cazul amilazei), după care, la concentrații mai mari, intervine efectul lui de inhibiție, caracteristic metalelor grele.

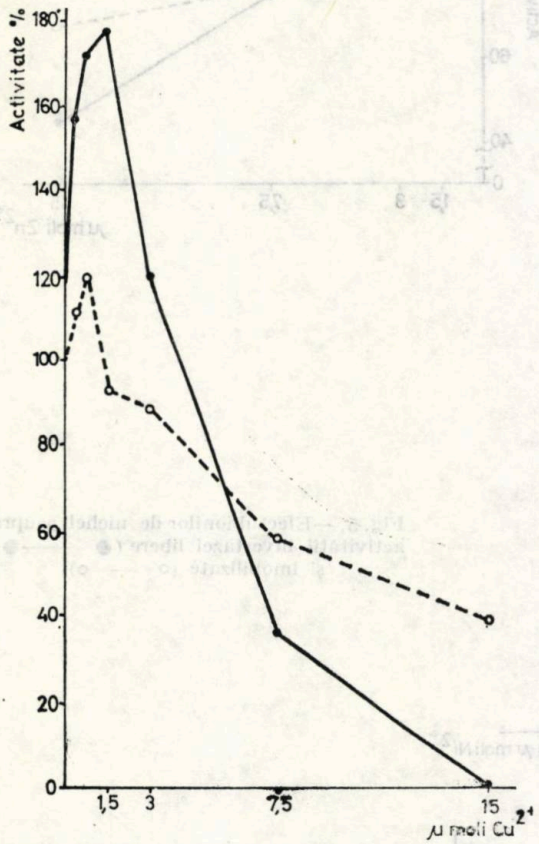


Fig. 7. — Influența diferitelor concentrații de Cu^{2+} asupra activității invertazei libere (●———●) și imobilizate (o- - - -o).

În cazul enzimei imobilizate, acest rol de stabilizare al enzimei este exercitat de suportul insolubil, colagenul, fapt ce explică activarea cu numai 20 % a activității inițiale și rezistența față de concentrațiile mari de efector utilizate.

CONCLUZII

1. Prin legarea covalentă a invertazei de membrane de colagen s-a obținut un preparat enzimatic cu un conținut proteic de 0,22 mg proteină/cm^2 și cu o activitate reziduală de 21 %.

2. Prin imobilizare, practic nu se modifică pH-ul optim al invertazei (4,5—5,0) și nici temperatura ei optimă de acțiune (55°C), enzima imobilizată devenind mai rezistentă față de temperaturi ridicate comparativ cu enzima liberă.

3. Prin imobilizare, invertaza își modifică afinitatea pentru substrat, prezentînd o constantă Michaelis diferită de cea a enzimei libere (K'_m = = 142,8 mM față de K_m = 125 mM).

4. Toți ionii metalici studiați au inhibat activitățile celor două preparate de invertază — dar într-o măsură mai redusă enzima imobilizată —, cu excepția Cu^{2+}, care în concentrații mici a exercitat un efect activator.

5. Prin folosiri repetate, preparatul imobilizat nu și-a modificat activitatea.

Prezentat la redacție
la 25 mai 1983

Institutul de științe biologice,
Laboratorul de biologie moleculară,
București, Splaiul Independenței nr. 296

KATALYTISCHE UNTERSUCHUNG DER AN KOLLAGENMEMBRANE GEBUNDENEN INVERTASE

ZUSAMMENFASSUNG

Die Invertase wurde in Anwesenheit eines löslichen Karbodiimids durch kovalente Bindung an Kollagenmembrane immobilisiert, wobei ein enzymatisch aktives Präparat mit einem Proteingehalt von 0,22 mg/cm² und einer Restaktivität von 21% erhalten wurde. Durch die Trägerfixierung stieg die Stabilität der Invertase gegenüber pH-Werten, die über dem pH-Optimum lagen, gegenüber höheren Temperaturen und gegenüber der Einwirkung von Inhibitoren (Metallionen). Das trägergebundene Enzym konnte ohne Einbuße seiner Aktivität wiederholte Male verwendet werden.

BIBLIOGRAFIE

1. D. DINELLI, W. MARCONI, F. MORISI, *Fiber-entrapped enzymes*, în *Methods in Enzymology*, vol. 44, sub red. K. MOSBACH, Academic Press, New York—San Francisco—London, 1976, p. 227.
2. W. MARCONI, S. GULINELLI, F. MORISI, Biotechnol. Bioeng., **16**, 501 (1974).
3. H. D. SCHELL, IRINA CORNOIU, St. cerc. biochim., **23**, 183 (1980).
4. G. MANECKE, S. SINGER, Makromol. Chem., **39**, 13 (1960).
5. H. SUZUKI, H. MAEDA, A. YAMANCHI, în *Immobilized enzyme technology — research and applications*, sub red. H. H. WEETALL, H. SUZUKI, Plenum Press, New York—London, 1975, p. 185.
6. H. MAEDA, H. SUZUKI, A. YAMANCHI, Biotechnol. Bioeng., **15**, 607 (1973).
7. H. SUZUKI, Y. OZAWA, H. MAEDA, Agr. Biol. Chem., **30**, 807 (1966).
8. G. GELLF, J. BOUCHRANT, Biochem. Biophys. Acta, **334**, 467 (1974).
9. G. ZARNEA, GH. MENCINICOPSCHI, ST. BRAGAREA, *Bioingineria preparatelor enzimatice microbiene*, Edit. tehnică, București, 1980, p. 245.
10. W. R. VIETH, K. VENKATHASUBRAMANIAN, *Collagen-immobilized enzyme systems*, în *Methods in Enzymology*, vol. 44, sub red. K. MOSBACH, Academic Press, New York—San Francisco—London, 1976, p. 260.

DEGRADAREA CATEPSINEI B_1 UMANE DE CĂTRE TRIPSINĂ

ELENA GANEA, MARIA ANDRAŞ

Rezumat. S-a urmărit comportarea catepsinei B_1 umane la tratamentul cu tripsină prin metode electroforetice, enzimatice şi imunochimice. Disc-electroforeza în gel de poliacrilamidă în mediu alcalin arată rezistenţa catepsinei la proteoliză în primele 5 ore de incubare, în acest interval producîndu-se numai uşoare modificări ale vitezei de migrare. Electroimunodifuzia şi determinările de activitate relevă modificări mai accentuate, datorate unor interacţiuni de tip proteină—proteină între enzimă şi substrat, avînd ca urmare schimbări în conformaţia moleculei de substrat. Deşi ca proteină enzima este rezistentă, activitatea sa scade în mediu alcalin pînă la 5,5 % în 2 ore. Tripsina manifestă un rol de „protejare" a enzimei faţă de pH-ul alcalin mai ales în primele 30 min. Rezultatele obţinute la electroimunodifuzie sînt concordante cu cele de activitate, confirmînd apropierea celor două situsuri : antigenic şi catalitic.

Mecanismul de degradare intracelulară a proteinelor este implicit legat de mecanismul prin care celula îşi reglează concentraţia propriilor sale proteine. Răspunzători de degradarea proteinelor endocitate (1) şi a celor intracelulare normale (2) sînt lizozomii. Se pare că ei sînt singurele organele echipate cu o gamă variată de proteaze, deşi prezenţa unor proteaze a fost semnalată şi în alte organele, ca şi în citoplasmă (3), (4). S-a sugerat că, în general, enzimele nelizozomale au o considerabilă specificitate de substrat, fiind răspunzătoare de reglarea selectivă a menţinerii echilibrului intracelular, în timp ce proteazele lizozomale sînt răspunzătoare de degradarea neselectivă întîlnită în stressul fiziologic (5).

Cele mai multe date din literatură se referă la degradarea proteinelor şi enzimelor de natură nelizozomală. Degradarea la nivelul lizozomilor a proteinelor proprii lizozomale este foarte puţin cunoscută. S-a arătat că ratele de degradare a proteinelor din membranele şi din fracţiunea solubilă a lizozomilor din ficatul de şobolan sînt heterogene (6) şi similare ca mărime cu ratele de degradare a proteinelor nelizozomale (7). Totuşi, se pare că binecunoscuta relaţie direct proporţională dintre mărimea moleculei şi viteza de degradare a diferitelor clase de proteine nu este valabilă pentru proteinele lizozomale (6). Studierea degradării enzimelor lizozomale se reduce la cîteva glicozidaze : β-glucuronidaza (8), β-galactozidaza (9) şi β-glucozidaza (10).

Catepsina B_1 este o endopeptidază lizozomală tiol-dependentă, preparată şi purificată din ficatul uman (11), de viţel (12), de şobolan (13), ca şi din alte ţesuturi, enzimă deosebit de importantă pentru degradarea intralizozomală a proteinelor. Modul de degradare a acestei enzime de către o altă protează, tripsina, constituie subiectul lucrării de faţă.

MATERIALE ȘI METODE

Prepararea și purificarea catepsinei B_1 umane. Ficatul uman normal, îndepărtat în cursul examinării post-mortem, a fost prelucrat în vederea obținerii catepsinei B_1, după metoda descrisă de Barett (11).

Prepararea serului imun anticatepsină B_1. Doi iepuri albi, adulți, au fost injectați cu catepsină B_1 în două reprize. La fiecare repriză s-a administrat fiecărui iepure cîte 1 mg catepsină B_1 într-un amestec bine omogenizat cu adjuvant Freund complet, repartizat în 10—12 injecții intradermice. Intervalul dintre cele două reprize a fost de două săptămîni. La 10 zile după ultima injecție, animalele au fost sîngerate din ureche pentru testarea apariției anticorpilor. În ziua următoare evidențierii prezenței acestora, s-a efectuat sîngerarea totală.

Determinarea concentrației proteice s-a efectuat prin măsurarea extincției la 280 nm și prin metoda Lowry (14), folosind ca standard serumalbumina bovină.

Determinarea activității enzimatice a catepsinei B_1. Activitatea catepsinei B_1 s-a determinat pe substrat sintetic BANA (N-benzoil B, L-arginin-2-naftilamidă) după metoda lui Barett (15). Se citește extincția la 520 nm față de o curbă etalon efectuată cu β-naftilamină. O unitate enzimatică = cantitatea de enzimă care eliberează 1 mM β-naftilamină/min.

Tratarea catepsinei B_1 cu tripsină. Comportarea catepsinei B_1, ca substrat la atacul cu tripsină, s-a urmărit după incubarea acestora la 37°C în raportul 1/50 (E/S), în tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 8, conținînd $CaCl_2$ 0,02 M. Incubarea s-a făcut în condiții identice pentru probele martor, fără tripsină, în aceleași intervale de timp. Modificările produse s-au evidențiat prin metode fizico-chimice, enzimatice și imunochimice.

Disc-electroforeza în gel de poliacrilamidă în mediu alcalin s-a efectuat după Davis (16). Evidențierea benzilor proteice s-a făcut prin colorare cu Amidoschwartz și spălare cu acid acetic 3%.

Electroimunodifuzia s-a efectuat, după metoda lui Laurell (17), în gel de agaroză 1% în tampon veronal, conținînd 10% ser anticatepsină B_1.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Comportarea unei endopeptidaze intralizozomale, catepsina B_1, la atacul unei alte proteaze a fost urmărită prin disc-electroforeza în gel de poliacrilamidă, electroimunodifuzia și determinarea activității enzimatice a catepsinei B_1. Ca enzimă proteolitică a fost aleasă tripsina, avînd un pH optim diferit de cel al catepsinei.

Disc-electroforeza în gel de poliacrilamidă a catepsinei B_1 tratate cu tripsină este ilustrată în figura 1. Se observă prezența a trei zone proteice. Barett (11) semnala pentru catepsina B_1 umană, la disc-electroforeza în PAA după Davis (16), existența unei zone proteice majore și a cîtorva zone minore cu mobilitate mai mică, fără să poată însă localiza activitatea catepsinei, care este inactivată la pH 9, la care a avut loc electroforeza. Pe baza unor date recente privind secvența parțială de aminoacizi a catepsinei B_1 (18) și din determinarea greutății moleculare a produșilor corespunzători zonelor proteice amintite, Katunuma și colab. (19) au atribuit banda majoră (greutate moleculară 29 000) catepsinei B_1, iar celelalte benzi unor fragmente proteice cu greutăți moleculare de 25 000 și 5 000, reprezentînd lanțul greu și, respectiv, lanțul ușor, provenite din scindarea moleculei de catepsină B_1.

Aspectul electroforetic al catepsinei B_1 tratate cu tripsină (fig. 1) suferă modificări foarte mici în raport cu proba martor, dovedind o rezistență a catepsinei la atacul proteolitic. Se observă o creștere a vitezei de migrare la probele incubate 15 min și 3 ore, datorită probabil expunerii unor grupări electronegative, ca urmare a unor modificări pe care

le produce tripsina asupra conformației catepsinei. Intensitatea benzilor rămîne însă nealterată pînă la 5 ore de incubare, cînd este ușor scăzută, remarcîndu-se abia după 23 ore o scădere accentuată a intensității cu dispariția completă a benzii cu viteza de migrare maximă. Asemenea

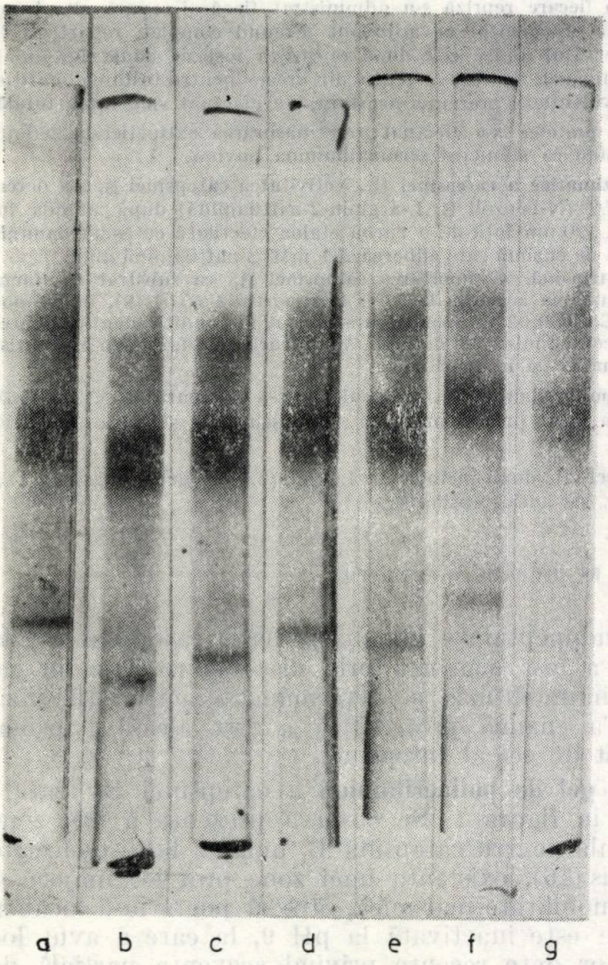


Fig. 1. — Disc-electroforeza în gel de PAA, mediu alcalin, a catepsinei B_1 incubate cu tripsină: *a*, timpul zero; *b*, 15 min; *c*, 30 min; *d*, 60 min; *e*, 3 ore; *f*, 5 ore; *g*, 23 ore.

variații ale vitezei de migrare electroforetică s-au întîlnit și la alte proteine incubate cu tripsină, și anume hemoglobina bovină, IgG umană (20) și β-glucozidaza din rinichi de șobolan (21). În toate aceste cazuri, în prima parte a reacției enzima produce modificări ale conformației moleculei de substrat, acțiunea proteolitică avînd loc numai după atingerea unei conformații optime, care permite accesul enzimei la locurile de scindare. Perioada premergătoare atacului proteazic propriu-zis, în care interacțiunea enzimă—substrat este de tipul proteină—proteină, diferă de la un substrat la altul: la IgG 60 min, la hemoglobină și β-glucozidază 2 ore (21), la catepsina B_1 începînd abia după 23 ore.

Electroimunodifuzia, realizată după metoda lui Laurell (17), este redată în figura 2. Antiserul preparat de noi recunoaște trei tipuri de molecule, care dau cu antigenul trei arcuri de precipitare: unul cu intensitate și viteză de migrare mai mari și două arcuri secundare prezentînd

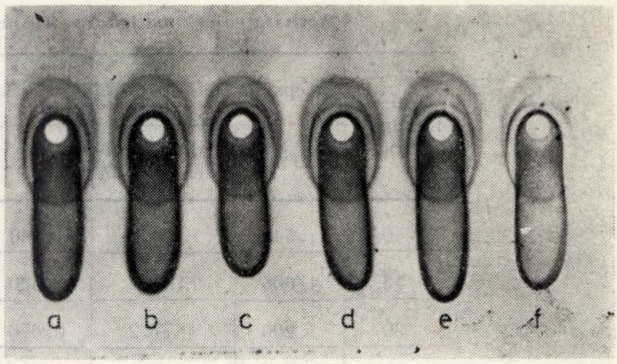


Fig. 2. — Electroimunodifuzia probelor de catepsină B_1 incubată cu tripsină: *a*, 30 min; *b*, timpul zero; *c*, 60 min; *d*, 3 ore; *e*, 5 ore; *f*, 15 min.

între ele identitate parțială. Încercările noastre de a determina activitatea catepsinei B_1 pe aceste arcuri nu au dat rezultate datorită inhibării activității enzimatice de către antiser. Bansal și colab. (22) au demonstrat această inhibare prin experiențe de dicroism circular, atribuind-o combinației anticorpului cu determinanții antigenici aflați în apropierea centrului activ. După cum arată figura 2, arcurile secundare nu prezintă modificări, în timp ce înălțimea arcului principal se modifică astfel:

Timp de incubare (min)	Înălțime (mm)
0	21
15	21
30	22
60	19
180	21
360	23

Creșterea înălțimii arcului de precipitare a probei incubate 30 min și scăderea sa la proba incubată 60 min, precum și creșterea la probele incubate timp mai îndelungat sînt modificări determinate de expunerea diferită a determinanților antigenici și a grupărilor încărcate electric, ca urmare a alterării conformației moleculei de substrat sub acțiunea tripsinei. Modificările demonstrate prin electroimunodifuzie sînt mai accentuate decît cele ilustrate la electroforeza în gel de PAA, metoda avînd o sensibilitate mai mare decît aceasta din urmă. O comportare asemănătoare prezenta și β-glucozidaza (21), modificarea înălțimii arcurilor de precipitare succedîndu-se însă în alt mod, specific acesteia.

Remarcăm totuși prezența nealterată a celor trei arcuri de precipitare și după 5 ore de incubare, ceea ce arată rezistența catepsinei B_1 la atacul cu tripsină, așa cum s-a văzut și la disc-electroforeză.

Activitatea enzimatică a catepsinei B_1. Activitatea catepsinei B_1 după incubarea cu tripsină diferite perioade de timp și după incubarea fără tripsină aceleași perioade este dată în tabela 1.

Tabela 1

Activitatea enzimatică a catepsinei B_1

Timp de incubare (min)	Catepsină B_1 + tripsină		Catepsină B_1	
	520 nm	% din activitatea inițială	520 nm	% din activitatea inițială
0	1,540	100,0	1,460	100,00
15	1,600	104,0	1,520	104,00
30	1,200	77,2	0,670	45,80
45	0,285	18,5	0,320	21,90
60	0,170	11,4	0,140	9,85
120	0,105	6,7	0,095	5,50

După 15 min de incubare, activitatea crește ușor și în mod egal atît la proba incubată cu tripsină, cît și la martor. Așadar, tripsina nu a modificat activitatea catepsinei. La probele incubate 30, 45, 60 și 120 min, are loc o scădere continuă a activității, dar de proporții diferite la proba incubată cu tripsină față de martor. Astfel, după 30 min de incubare cu tripsină, catepsina B_1 păstrează 77,2 % din activitatea inițială, în timp ce martorul menține doar 45,8 % din activitate. La intervale mai lungi, activitatea scade în ambele cazuri, rămînînd totuși mai mare la proba tratată cu tripsină decît la martor. Scăderea activității catepsinei B_1 în timp la proba martor se explică prin instabilitatea enzimei la pH alcalin, demonstrată de Barett pentru catepsina B_1 umană și de Otto (23) și Franklin (24) pentru enzima din splină bovină. Tripsina reduce efectul de inactivare produs de pH-ul alcalin, mai ales în primele 30 min de incubare, manifestînd o acțiune de „protejare" a moleculei de catepsină. În același sens, într-o lucrare anterioară se demonstra creșterea activității peroxidazice a hemoglobinei în primele 10—25 min de incubare cu tripsină, urmată de scăderea ulterioară a activității peroxidazice și de degradarea corespunzătoare a moleculei de hemoglobină (20). Lacombe și Hanoune (25) au găsit de asemenea o creștere a activității guanilatciclazei în urma tratamentului cu tripsină, α-chimotripsină, papaină și termolizină. Numărul exemplelor de enzime activate prin proteoliză limitată a crescut considerabil în ultima vreme. În unele cazuri, această activare se explică prin scindarea în timpul sau după transportul în lizozomi a unor precursori inactivi de greutate moleculară mare, cu formarea enzimelor active (32). Astfel de precursori s-au descris pentru numeroase enzime, printre care catepsina D (26) și β-glucuronidaza (27). Pentru catepsina B_1 nu am găsit semnalată prezența unui precursor. Deci, activitatea crescută față

de martor a catepsinei tratate cu tripsină s-ar explica prin alt mecanism : probabil că în prima parte a incubării interacțiunea de tip proteină—proteină dintre catepsină și tripsină produce o anumită aranjare spațială a lanțurilor grele și ușoare ale catepsinei, expunînd mai mult sau mai puțin zona centrului activ, precum și grupe cu diferite încărcări electrice, ceea ce s-a evidențiat prin modificarea mobilității electroforetice în gel (fig. 1). Un argument în favoarea acestei ipoteze poate fi și modificarea proprietăților imunochimice (fig. 2) odată cu activitatea (tabela 1), centrul antigenic aflîndu-se în apropierea situsului activ (22).

Modificările conformaționale produse de tripsină în molecula catepsinei ar putea fi asemănătoare cu cele produse de diferitele valori de pH. Bansal și colab. (22) au demonstrat, pe baza studiilor de dicroism circular și spectre electronice, prezența unei structuri înalt organizate a catepsinei la pH 7 comparativ cu pH 5,6 și 10,2 ; la pH neutru predomină prezența α-helicoidală, în timp ce la pH 5,6 structura este mai mult de tip β ; la pH 10,2 are loc o ușoară dezorganizare a moleculei, indicată de scăderea piscului de la 202 nm al curbei de dicroism circular.

În lucrări anterioare s-a arătat că unul din factorii ce explică rezistența unor proteine la degradarea proteolitică este partea lor glucidică (29), (30), (31). Acesta este și cazul enzimelor lizozomale, care în majoritate sînt glicoproteine (32). Catepsina B_1 se pare că nu este o glicoproteină, structura ei spațială fiind probabil cea care impune comportarea descrisă în această lucrare. Între molecula enzimei substrat și cea a tripsinei au loc interacțiuni ce au ca rezultat modificarea mobilității electroforetice, a activității enzimatice și a proprietăților antigenice, după cum s-a relatat. Asemenea interacțiuni s-au mai descris în literatură, cum este cazul celor de natură electrostatică dintre enzimele ciclului acidului citric și cele ale interconversiei aspartat—malat (33), ele avînd la bază modificări conformaționale produse prin plierea și deplierea moleculelor proteice. Din numeroasele stări conformaționale intermediare posibile teoretic, pe care le poate căpăta o proteină în timpul plierii și deplierii ei, în vederea atingerii unei conformații finale, numai o parte sînt posibile. Kosen și colab. (34) au demonstrat prin metode de spectroscopie diferențială în UV fenomenul de pliere și depliere a moleculei tripsin-inhibitorului pancreatic bovin prin ruperea punților disulfidice existente 30—51, 5—55 și 14—38 și rearanjarea lor sub altă formă. Catepsina B_1, care conține astfel de punți disulfidice în moleculă, poate urma de asemenea astfel de modificări.

Prezentat la redacție
la 25 mai 1983

Institutul de științe biologice,
Laboratorul de imunochimie,
București, Splaiul Independenței nr. 296

HUMAN CATHEPSIN B_1 DEGRADATION BY TRYPSIN

SUMMARY

The degradation of human cathepsin B_1 by trypsin was studied by electrophoretical, enzymatic and immunochemical methods. Alkaline PAA disc-electrophoresis showed the resistance of cathepsin B_1 to proteolysis during the first five hours of incubation, with slight changes of

electrophoretical mobility. Electroimmunodiffusion and the enzymic activity assay demonstrated stronger changes, due to the protein-protein interactions between the enzyme and the substrate and consequently to the conformational changes of the substrate molecule.

Although, cathepsin B_1 behaved as a protein resistant to the proteolytic attack, its activity decreases at alkaline pH up to 5.5% during the first two hours. It seems that trypsin protects the cathepsin against the alkaline pH mostly for the first 30 minutes. The results obtained by electroimmunodiffusion agree with those of enzymic activity assay suggesting that the antigenic determinants are situated near the catalytic site.

BIBLIOGRAFIE

1. C. A. SCORNIK, V. BOTBOL, J. Biol. Chem., **251**, 2891 (1976).
2. J. T. DINGLE (sub red.), în *Lisosomes in biology and pathology*, vol. 3, North-Holland Publishing Co., Amsterdam, 1973.
3. K. KATUNUMA, E. KOMINANI, K. KOBAYASHI et al., Eur. J. Biochem., **52**, 37 (1975).
4. B. L. HORECKER, P. S. LAZO, O. TSOLAS, S. C. SUN, în *Protein turnover and lysosomal function*, sub red. H. L. SEGAL, D. J. DOYLE, Academic Press, New York, 1978, p. 333.
5. E. LOVAAS, FEBS Letters, **45**, 244 (1974).
6. C. C. WANG, O. TOUSTER, J. Biol. Chem., **250**, 4896 (1975).
7. A. L. GOLDBERG, J. F. DICE, Ann. Rev. Biochem., **43**, 835 (1974).
8. K. SMITH, R. E. GANSCHOW, J. Biol. Chem., **253**, 5437 (1978).
9. O. P. VAN DIGGELEN, A. T. HOOGVEEN et al., Biochim. Biophys. Acta, **703**, 69 (1982).
10. E. GANEA, M. ANDRAŞ, St. cerc. biochim., **25**, 14 (1982).
11. A. J. BARETT, Biochem. J., **131**, 809 (1973).
12. O. SNELLMAN, Biochem. J., **114**, 673 (1969).
13. K. MATSUDA, E. MISAKA, J. Biochem., **76**, 639 (1974).
14. O. H. LOWRY, N. J. ROSENBROUGH, A. L. FARR, R. J. RANDALL, J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951).
15. A. J. BARETT, Analit. Biochem., **47**, 280 (1972).
16. B. J. DAVIS, Ann. N.Y. Acad. Sci., **121**, 404 (1964).
17. C. E. LAURELL, Analit. Biochem., **15**, 45 (1966).
18. K. TAKIO, T. TOWATARI, K. KATUNUMA, K. TITANI, Biochem. Biophys. Res. Commun., **97**, 340 (1980).
19. K. KATUNUMA, T. TOWATARI, E. KOMINAMI, S. HASHIDA, K. TAKIO, Acta biol. med. germ., **40**, 1419 (1981).
20. E. GANEA, Ş. A. HULEA, C. MOTAŞ, Rev. roum. Biochim., **18**, 261 (1981).
21. E. GANEA, M. ANDRAŞ, St. cerc. biochim., **25**, 14 (1982).
22. R. BANSAL, S. SINGH, J. R. KIDWAI, Ind. J. Biochem. Biophys., **18**, 110 (1981).
23. K. OTTO, în *Tissue proteinases*, sub red. A. J. BARETT, J. T. DINGLE, North-Holland Publishing Co., Amsterdam, 1971, p. 1—28.
24. S. G. FRANKLIN, R. M. METRIONE, Biochem. J., **127**, 207 (1972).
25. N. L. LACOMBE, J. HANOUNE, J. Biol. Chem., **254**, 3696 (1979).
26. V. PUIZDAR, V. TURK, FEBS Letters, **132**, 299 (1981).
27. J. A. BROWN, G. P. JAHREIS, R. T. SWANK, Biochem. Biophys. Res. Commun., **99**, 691 (1981).
28. U. LILL, A. SCHREIL, H. EGGERER, Eur. J. Biochem., **125**, 645 (1982).
29. E. GANEA, Z. MOLDOVEANU, C. MOTAŞ, St. cerc. biochim., **21**, 163 (1978).
30. L. BUZILĂ, C. MOTAŞ, Rev. roum. Biochim., **14**, 155 (1977).
31. L. K. TADROS, D. ANDREI, C. MOTAŞ, St. cerc. biochim., **25**, 59 (1982).
32. J. M. W. BOUMA, în *Enzyme therapy in lysosomal storage diseases*, sub red. J. M. TAGER et al., North-Holland Publishing Co., Amsterdam, 1974.
33. S. BEECKMANS, L. KANAREK, Eur. J. Biochem., **117**, 527 (1981).
34. PH. A. KOSEN, T. E. CREIGHTON, E. R. BLOUT, Biochemistry, **19**, 4936 (1980).

INFLUENȚA TOLUENULUI ȘI A ALTOR SOLVENȚI ORGANICI ASUPRA ACTIVITĂȚII ATP-azei Mg^{2+}-DEPENDENTE DIN DROJDIA DE BERE

VL. GHEORDUNESCU, ANGELA ȘOAITĂ

Rezumat. Celule de *Saccharomyces carlsbergensis* au fost agitate cu diferite concentrații de toluen diferite intervale de timp, iar activitatea ATP-azei Mg^{2+}-dependente a fost determinată prin adăugarea ATP în suspensie. Maximum de activitate enzimatică a fost obținut cînd suspensia de celule a fost agitată timp de 10 min cu toluen 2% și incubată 30 min cu ATP. La concentrații mai mari de toluen (5%) și la timpi mai lungi de contact cu solventul, s-a observat o inhibiție a activității ATP-azei. Acetatul de butil a fost de 2,8 ori mai eficient decît toluenul, iar p-xilenul a avut efectul cel mai slab în evidențierea activității acestei enzime din celulele de *S. carlsbergensis*.

Scopul cercetării de față a fost studiul influenței toluenului și a altor solvenți organici asupra activității ATP-azei din drojdia de bere. Inițial am căutat un procedeu simplu și eficient de eliberare a ATP-azei Mg^{2+}-dependente din celula de drojdie, fără a apela la mijloace fizice drastice și dificile; dintre acestea amintim utilizarea presei French sau disruperea cu Waring Blendor, după înghețare în azot lichid (1), (2). După tratamentul cu azot lichid poate urma mojararea cu nisip de cuarț, la care se adaugă, eventual, înghețarea—dezghețarea repetată cu zăpadă carbonică (3).

Din practica industriei, care utilizează în diferite scopuri drojdie de bere, se cunoaște că, la tratarea cu toluen a celulelor („lizat de drojdie"), se pot obține în soluție unele componente celulare cu greutate moleculară mică. Observațiile noastre preliminare au arătat că, pentru concentrații mici de toluen și timp scurt de agitare cu acest solvent, celulele de drojdie nu suferă o liză propriu-zisă, ci numai o permeabilizare a peretelui, ceea ce permite un schimb de substanțe cu greutate moleculară mică între citoplasmă și mediu. Acest fapt l-am pus pe seama solubilizării parțiale a componentelor lipidice din peretele celular (1), (4) și din membrana plasmatică (5).

Menționăm utilizarea toluenului într-o etapă intermediară — nu pentru liza celulelor — la prepararea aminopeptidazei din rinichi de porc (6).

Am încercat utilizarea tratamentului cu toluen, modificat din punctul de vedere al condițiilor de contact cu acest solvent, pentru eliberarea ATP-azei Mg^{2+}-dependente din celula de drojdie de bere, și determinarea activității sale enzimatice. Ulterior, vom arăta că a fost obținută o activitate enzimatică fără ca ATP-aza să fie eliberată în mediu; enzima a fost

evidenţiată prin incubarea în prezenţa ATP a celulelor permeabilizate sau a fragmentelor celulare, care apar în cazul unor condiţii energice de tratament cu toluen.

Ne-am propus un studiu al condiţiilor de atac cu acest solvent asupra suspensiei de celule de drojdie, astfel încît să rezulte o activitate maximă a ATP-azei Mg^{2+}-dependente. Ulterior, în aceeaşi ordine de idei, am utilizat şi alte substanţe cunoscute ca solvenţi pentru lipide, precum şi substanţe înrudite chimic cu toluenul.

Se cunoaşte existenţa unei ATP-aze Mg^{2+}-dependente legate de membrana plasmatică (1), (5), (7), (8), (9); este cunoscută şi intens studiată şi ATP-aza Mg^{2+}-dependentă din mitocondrii (2), (10), (11). ATP-aza din membrana plasmatică are optimum de activitate la pH 7,2—7,4 (8), (9); cea mitocondrială a fost studiată la pH 8,0 (2), (10). Anticipînd, vom spune că, deşi determinările noastre au fost efectuate la pH 8,0, avem motive să credem că ATP-aza mitocondrială Mg^{2+}-dependentă a avut un rol minor sau neglijabil.

Tratamentul cu toluen şi cu alţi solvenţi organici poate interesa nu numai prin accesibilitatea sa, dar şi prin posibilitatea obţinerii altor enzime, de exemplu RN-aze (12) şi proteaze din drojdie. De altfel, noi am determinat activitatea proteolitică în mediu după tratamentul celulelor de drojdie cu toluen, prin liza acestora şi centrifugare.

MATERIAL ŞI METODE

Suspensia de celule de drojdie. S-a folosit o tulpină de *Saccharomyces carlsbergensis*, obţinută de la Fabrica de bere „Griviţa" din Bucureşti; am utilizat drojdie de bere de 48 ore, de fermentaţie primară, obţinută direct din linul de fermentare. Celulele au fost depuse prin centrifugare la rece (1500 rotaţii/min, 5 min) şi spălate cu apă distilată de două ori, după care au fost din nou depuse în aceleaşi condiţii. Suspensia de drojdie supusă ulterior atacului cu toluen a fost realizată în proporţia 1 g drojdie pastă : 4 ml apă distilată.

Reactivi. S-au folosit următoarele substanţe : ATP.Na_4.4 H_2O 99,5 % (produs şi estimat de Fabrica de medicamente „Biofarm"), $NaHSO_3$, $Na_2S_2O_5$, $MgSO_4$, $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$.4 H_2O (toate de puritate analitică, Reactivul); acid 1,2,4-aminonaftolsulfonic (Fluka); acid triclor-acetic (Serva); cazeină solubilă (B.D.H.).

Solvenţi : toluen (Reactivul); n-hexanol (Fluka); izobutanol (B.D.H.); n-heptan (Fluka); 1,2,3,4-tetrahidronaftalina (THN) (Loba Chemie); o-xilen (pur, U.R.S.S.); m-xilen (Fluka); p-xilen (Fluka); acetat de butil (tehnic, Combinatul chimic Rişnov); dimetilsulfoxid (DMSO) (Merck).

Soluţia „eiconogen", care serveşte ca reducător al fosfomolibdatului, s-a preparat prin dizolvarea a 6 g $NaHSO_3$ sau 5,182 g $Na_2S_2O_5$ şi 0,1 g acid 1,2,4-aminonaftolsulfonic în 60 ml apă distilată. Soluţiile tampon utilizate au fost tris 0,05 M —HCl, pH 8,0 şi veronal 0,05 M —HCl, pH 8,0.

Tratamentul cu toluen. S-au folosit concentraţii de 0,2 %, 2 % şi 5 % faţă de volumul suspensiei de celule de drojdie. Toluenul a fost lăsat în contact cu suspensia de drojdie 10, 20 şi 30 min, sub agitare (care a fost realizată în condiţii identice pentru toate variantele, cu ajutorul unui agitator magnetic de laborator, la 1/2 din viteza maximă de rotaţie). Temperatura utilizată : 25°C.

Determinarea activităţii enzimatice a ATP-azei Mg^{2+}-dependente. În acest scop s-au folosit metoda Perry (13) şi condiţiile de incubare pentru ATP-aza din drojdie, utilizate de Tzagoloff (2), (10), modificate de noi. Amestecul de incubare conţinea în prima variantă : 1 ml tampon tris (pH 8,0); 0,1 ml $MgSO_4$ 0,04 M; 0,06 ml extract enzimatic (supernatant obţinut prin centrifugarea celulelor de drojdie după tratamentul cu toluen) şi 0,3 ml ATP.Na_4 0,05 M. După incubare 20 min la 37°C, reacţia a fost stopată cu 1 ml TCA 15 %. Martorii au cuprins aceleaşi ingrediente, iar substratul s-a adăugat după inactivarea cu TCA. Pentru o precipitare

cît mai completă, probele și martorii s-au menținut într-o baie de apă cu gheață timp de 15 min. Apoi s-au centrifugat la 5000 rotații/min timp de 30 min, la 4°C.

Deoarece tratamentul cu toluen în concentrațiile menționate, la 25°C, urmat de centrifugare, nu a fost în măsură să elibereze ATP-aza în supernatant, am procedat la a doua variantă: păstrînd proporțiile de volume menționate pentru prima variantă, dar înlocuind supernatantul chiar cu suspensie de drojdie tratată cu toluen, s-au prelevat la anumite intervale de timp alicote, în care reacția a fost stopată cu TCA. (În aceste cazuri, incubarea a avut loc la 25°C.) În continuare s-a procedat ca mai sus.

În ambele variante, în supernatantul obținut după tratamentul cu TCA și centrifugare s-a determinat fosforul anorganic prin metoda Fiske-Subbarow (14), ușor modificată: un volum de 0,5 ml extract de TCA s-a diluat cu 1,5 ml apă distilată; s-au adăugat 0,4 ml molibdat de amoniu 2,5 % în H_2SO_4 5 n și 0,1 ml eiconogen; probele și martorii au fost ținuți 5 min în baie de apă la 37°C, pentru dezvoltarea culorii, după care s-au citit față de apă distilată la 660 nm, la un spectrofotometru Spekol. Curba de calibrare s-a realizat în aceleași condiții, utilizîndu-se diferite concentrații de K_2HPO_4, înlocuind cei 0,9 ml (extract enzimatic + soluție ATP) cu 0,1—0,9 ml soluție 2,4 μmol P/ml, iar în locul soluției de Mg^{2+} punînd apă distilată. Activitatea enzimatică a ATP-azei s-a exprimat în μmol P/ml amestec de incubare. Timpul fiind, în cadrul acestei lucrări, un parametru important de variație a activității ATP-azei Mg^{2+}-dependente, nu s-a raportat activitatea enzimatică la timp.

Determinarea activității proteazice. S-a folosit o modificare a metodei Kunitz (15), pe care o descriem succint: 1 ml supernatant, obținut prin centrifugarea suspensiei de drojdie, după tratarea acesteia cu toluen, s-a incubat 2 ore, la 25°C, cu 1 ml cazeină solubilă 1 % în tampon veronal, pH 8,0. Reacția a fost stopată cu 3 ml TCA 5 %, iar eprubetele s-au lăsat 15 min într-o baie de apă cu gheață; s-au centrifugat apoi 30 min la 5000 rotații/min la rece, la o centrifugă Janetzki K-23. Pentru martori s-au utilizat aceleași condiții, cu deosebirea că incubarea a decurs fără extract enzimatic, care s-a adăugat după cei 3 ml TCA 5 %. Supernatantele probelor s-au citit, față de supernatantele martorilor corespunzători, la un spectrofotometru Spekord UV—VIS. S-a definit unitatea enzimatică drept cantitatea de protează care, în condițiile testului, realizează o diferență de densitate optică între probă și martor egală cu unitatea, în 15 min digestie.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Prin agitare cu toluen 0,2 %, 2 % și 5 % a suspensiei de celule de drojdie, timp de 10, 20 sau 30 min, la 37°C, urmată de centrifugare, nu se eliberează ATP-ază în mediu; toate încercările în acest sens nu au dat rezultate pozitive. După cum vom arăta ulterior, chiar la intervale de contact mai mari, cînd celulele sînt practic distruse, ATP-aza nu se regăsește în mediu, fiind antrenată odată cu resturile celulare la centrifugare.

De asemenea, rezultate negative s-au obținut și în cazurile în care suspensia de drojdie a fost lăsată peste noapte în prezența toluenului, la 4°C. Menționăm că un astfel de tratament a dus, totuși, la rezultate favorabile în obținerea RN-azei din drojdie (12).

În aceste condiții am apelat la cealaltă variantă, în care, după agitare cu toluen, la 25°C, peste suspensia de drojdie s-au adăugat direct ATP, Mg^{2+} și tampon, realizînd astfel amestecul de incubare necesar dezvoltării activității enzimatice, de asemenea la 25°C. Desigur că, în aceste cazuri, nu poate fi ignorat faptul că acțiunea toluenului se prelungește în timpul incubării.

Pentru început am determinat influența timpului de incubare asupra activității ATP-azei din celule inițial agitate 10, 20 și 30 min cu toluen și supuse, în continuare, acțiunii acestuia în timpul incubării cu substrat. Rezultatele sînt expuse în figura 1.

Considerînd întregul interval de incubare cu ATP, apare o creștere evidentă a activității ATP-azei la toate cele trei intervale de timp de pretratare cu toluen. Aspectul celor trei curbe prezintă un interes deosebit: după o scădere ușoară a activității ATP-azei între 10 și 20 min incubare, urmează o creștere continuă pentru 20 și 30 min agitare cu toluen, ultima curbă avînd o pantă mai pronunțată. Pentru 10 min agitare cu toluen se constată o nouă scădere pînă la 60 min, apoi o creștere. În stadiul actual al cercetărilor noastre considerăm că ar fi hazardată o explicație a minimelor celor trei curbe de activitate a ATP-azei în funcție de timpul de incubare (iar pentru curba de 10 min agitare cu toluen două minime).

Contactul efectiv al celulelor de drojdie cu toluen timp de 2 ore nu a eliberat ATP-ază în supernatant. Examinarea la microscop a suspensiei a arătat distrugerea marii majorități a celulelor. Astfel, ATP-aza pare să fie antrenată cu resturile celulare în timpul centrifugării. În aceste

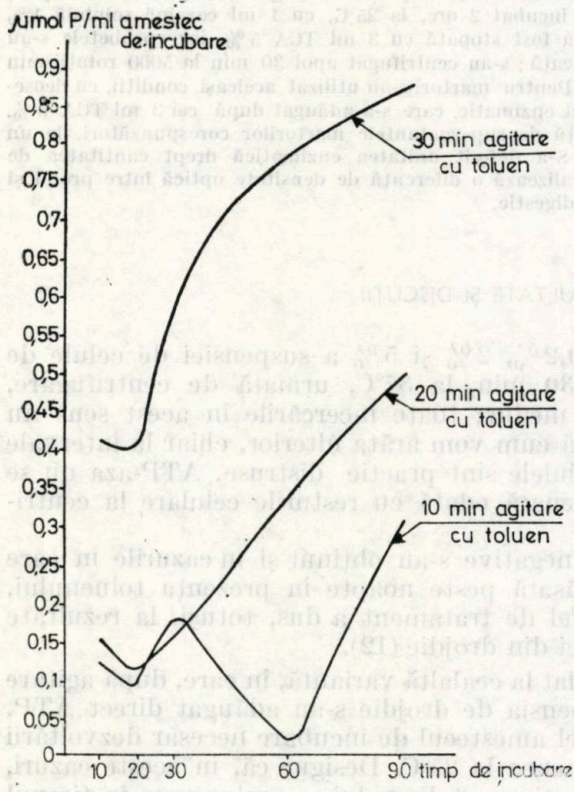


Fig. 1. — Influența timpului de incubare cu substrat (ATP) și celelalte ingrediente asupra activității ATP-azei Mg^{2+}-dependente din celulele de *S. carlsbergensis* în suspensie, agitate în prezența toluenului 2%.

condiții este improbabil ca mitocondriile să fie antrenate în depozit, de către pereții celulari fragmentați, la turația utilizată (1500 rotații/min). Cu toate acestea, optimum de activitate a ATP-azei Mg^{2+}-dependente din membrana plasmatică este 7,2—7,4 (8), (9), iar determinările noastre

au fost efectuate la pH 8,0; ar fi vorba deci de o activitate mai slabă, nu la pH optim, a ATP-azei din membrana plasmatică.

Aceste aspecte vor fi elucidate într-o lucrare ulterioară prin separare de mitocondrii, respectiv de membrană plasmatică din *S. carlsbergensis*, tulpina utilizată, şi prin determinarea pH-urilor optime de activitate ale ATP-azelor Mg^{2+}-dependente respective.

Pentru acelaşi interval de contact efectiv cu toluen (agitare cu solvent + incubare cu substrat în prezenţa toluenului), s-a determinat activitatea proteolitică în supernatant, la pH 8,0; aceasta a fost de *0,165 unităţi*. Nu se pune problema unei activităţi proteolitice extracelulare. Ahearn şi colab. (16) nu au găsit o astfel de activitate pentru *S. carlsbergensis* sau *S. cerevisiae*, determinările fiind pozitive pentru alte genuri de drojdie. Determinările noastre preliminare confirmaseră acest fapt.

Desigur că ATP-azele în discuţie ocupă în celulă nişte poziţii particulare din punctul de vedere al legării şi înglobării în organitele respective. Obţinerea acestor enzime şi intervenţia cu toluen în unele etape ale purificării lor ar putea să clarifice, cel puţin în parte, comportarea lor.

În continuare, am luat în consideraţie concentraţii diferite de toluen pentru tratamentul celulelor de drojdie: 0,2%, 2% şi 5%; pentru fiecare dintre aceste concentraţii am considerat două intervale de agitare cu toluen: 10 şi 30 min. În cadrul fiecăreia dintre aceste variante am ales

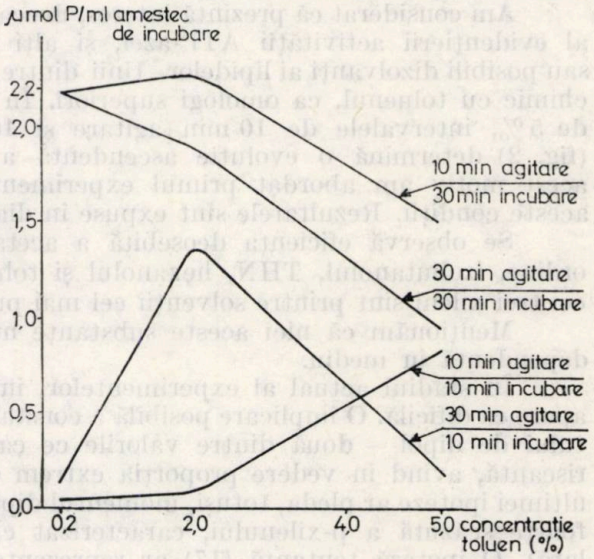


Fig. 2. — Influenţa concentraţiei de toluen, a timpului de agitare cu acest solvent şi a timpului de incubare în prezenţa ATP asupra activităţii ATP-azei Mg^{2+}-dependente din celulele de *S. carlsbergensis*.

două intervale de timp incubare cu ATP, în prezenţa solventului, respectiv 10 şi 30 min, fiind de aşteptat ca la asemenea intervale mici de timp diferenţele dintre variantele experimentale să fie mai uşor de sesizat. Rezultatele sînt expuse în figura 2.

Acest experiment sugerează următoarele:

— Pentru concentrații mici de toluen (0,2%), timpul de agitare cu solvent are o importanță minoră; activitatea ATP-azei este influențată numai de timpul de incubare cu substrat (în prezența solventului).

— Pentru concentrații mai mari de toluen (2%), la aceiași timpi de agitare cu solvent (pentru 10, respectiv 30 min), timpii de incubare cu ATP arată în fiecare caz importanța mai mare a acestui ultim parametru. Pentru același timp de incubare (10 min) însă, începe să conteze timpul de agitare cu solvent: 30 min agitare conduce la o activitate ATP-azică mai mare decît 10 min agitare cu toluen. Este de remarcat că, pentru celălalt interval de incubare cu substrat (30 min), intervalul de 30 min agitare cu toluen are ca urmare o scădere a activității enzimatice față de 10 min agitare cu solvent. Subliniem aceasta fiindcă este un prim semnal al unei activități de inhibare prin concentrații și prin timpul de contact al toluenului asupra ATP-azei urmărite.

— Acest efect de inhibiție se menține, după cum era de așteptat, pentru concentrația de 5% toluen (30 min incubare cu substratul) și se extinde chiar și pentru intervalul de 10 min incubare cu ATP; 10 min agitare cu toluen au ca rezultat o activitate enzimatică mai intensă decît 30 min agitare cu solvent.

Concluzia este că, dintre concentrațiile de toluen considerate, cea de 2% are probabilitatea cea mai mare de a realiza activitatea ATP-azică maximă, dacă se utilizează timpii de 10 min agitare cu acest solvent și 30 min incubare cu substratul și cu celelalte ingrediente (întregul experiment desfășurîndu-se la 25°C).

Am considerat că prezintă interes, deocamdată din punctul de vedere al evidențierii activității ATP-azei, și alți solvenți organici, cunoscuți sau posibili dizolvanți ai lipidelor. Unii dintre aceștia, xilenii, sînt înrudiți chimic cu toluenul, ca omologi superiori. În cazul acestuia, concentrația de 5%, intervalele de 10 min agitare și 10 min incubare cu substrat (fig. 2) determină o evoluție ascendentă a activității ATP-azice. Din acest motiv am abordat primul experiment privind solvenții utilizînd aceste condiții. Rezultatele sînt expuse în diagrama din figura 3.

Se observă eficiența deosebită a acetatului de butil; urmează, în ordine, izobutanolul, THN, hexanolul și toluenul; în mod surprinzător, cei trei xileni sînt printre solvenții cei mai puțin eficienți.

Menționăm că nici aceste substanțe nu eliberează ATP-ază Mg^{2+}-dependentă în mediu.

În stadiul actual al experimentelor, interpretarea acestor rezultate apare ca dificilă. O implicare posibilă a constantei dielectrice sau a momentului de dipol — două dintre valorile ce caracterizează solvenții — este riscantă, avînd în vedere proporția extrem de mare a apei (în favoarea ultimei ipoteze ar pleda, totuși, momentul dipol zero, împreună cu eficiența foarte scăzută a p-xilenului, caracterizat chimic prin simetrie moleculară). O ipoteză tentantă (17) ar reprezenta-o acțiunea de „cvasidetergenți" a acestor solvenți asupra lipidelor în pseudoemulsia apoasă, datorată agitării. De altfel, nu sîntem în măsură să operăm o distincție — pînă la purificarea ATP-azelor implicate — între eficiența acestor substanțe ca dizolvanți ai lipidelor și posibila acțiune a unora dintre ele ca inhibitori, într-un fel sau altul, ai ATP-azei însăși.

Scopul nostru a fost, pentru început, o abordare a solvenților organici, pentru a-i utiliza la evidențierea ATP-azei Mg^{2+}-dependente în celula de drojdie de bere. În acest sens, acetatul de butil se impune pentru utilizările viitoare.

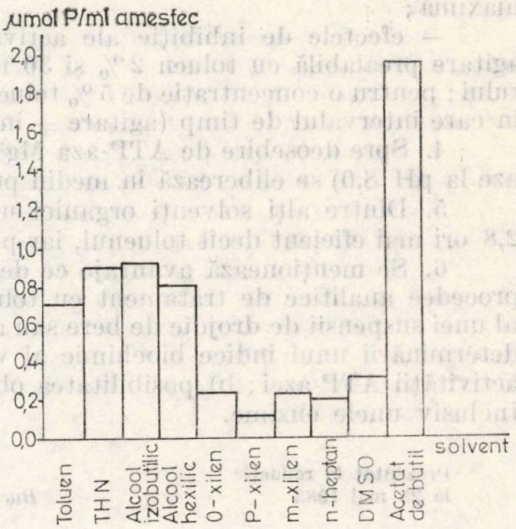


Fig. 3. — Influența solvenților organici asupra activității ATP-azei Mg^{2+}-dependente din celulele de *S. carlsbergensis* în suspensie. Concentrația solvenților utilizați: 5%; timpul de agitare a celulelor de drojdie cu solventul : 10 min; timpul de incubare a celulelor în prezența ATP : 10 min.

Deși nu permite eliberarea ATP-azei Mg^{2+}-dependente în mediu, tratamentul cu toluen (eventual cu acetat de butil) oferă posibilitatea determinării activității acestei enzime. Întrucît activitatea ATP-azică dintr-o celulă reprezintă un indice de apreciere a intensității metabolismului celular, urmează ca îmbunătățirea din punct de vedere analitic a procedeului să conducă la o metodă rapidă și sensibilă de estimare pe cale biochimică a viabilității, poate și a fazelor de creștere, a unei culturi de drojdie sau alt microorganism.

În plus, tratamentul cu toluen facilitează în mod considerabil, din punct de vedere practic, abordarea unor aspecte ale conținutului celular; într-adevăr, sînt cunoscute dificultățile de rupere a celulei drojdiei de bere, din cauza rezistenței deosebite a peretelui său celular.

În afară de aceasta, alte enzime, de exemplu proteaze (cu activitate la pH 8,0) și RN-aze (12), pot fi puse în libertate prin tratamentul drojdiei în suspensie celulară cu acest solvent.

CONCLUZII

1. Prin atacul toluenului 0,2—5% asupra celulelor de *S. carlsbergensis*, între 10—120 min interval de contact, nu se eliberează ATP-ază Mg^{2+}-dependentă în mediu; prin incubarea celulelor tratate cu toluen în mediul necesar activității enzimatice, aceasta este pusă în evidență.

2. S-a studiat influența timpului de incubare a enzimei la trei intervale de agitare cu toluen 2%; s-a observat, în general, o creștere a activității ATP-azei în funcție de timpul de incubare.

3. Prin variaţia concentraţiilor de toluen, a timpului de agitare cu solvent şi a timpului de incubare a enzimei cu substratul, în prezenţa solventului, am stabilit că :

— concentraţia de 2% toluen, agitarea prealabilă de 10 min cu toluen şi incubarea de 30 min cu ATP conduc la activitate ATP-azică maximă ;

— efectele de inhibiţie ale activităţii enzimatice încep la 30 min agitare prealabilă cu toluen 2% şi 30 min incubare în prezenţa substratului ; pentru o concentraţie de 5% toluen, inhibiţia apare în toate cazurile în care intervalul de timp (agitare + incubare) depăşeşte 40 min.

4. Spre deosebire de ATP-aza Mg^{2+}-dependentă, alte enzime (proteaze la pH 8,0) se eliberează în mediu prin tratamentul cu toluen.

5. Dintre alţi solvenţi organici utilizaţi, acetatul de butil este de 2,8 ori mai eficient decît toluenul, iar p-xilenul este cel mai puţin eficace.

6. Se menţionează avantaje ce decurg din punerea la punct a unor procedee analitice de tratament cu toluen (eventual cu acetat de butil) al unei suspensii de drojdie de bere sau alt microorganism : a) posibilitatea determinării unui indice biochimic al viabilităţii celulare prin estimarea activităţii ATP-azei ; b) posibilitatea obţinerii unor componente celulare, inclusiv unele enzime.

Prezentat la redacţie
la 25 mai 1983

Institutul de ştiinţe biologice
Bucureşti, Splaiul Independenţei nr. 296

THE EFFECT OF TOLUENE AND OTHER ORGANIC SOLVENTS ON THE Mg^{2+}-DEPENDENT ATPase ACTIVITY FROM YEAST

SUMMARY

Saccharomyces carlsbergensis cells were shaken for various periods of time in the presence of different concentrations of toluene and the Mg^{2+}-dependent ATPase activity was determined in the suspension using ATP as substrate. The highest enzyme activity was recorded when cell suspensions were stirred for 10 min in the presence of 2% toluene and incubated for 30 min with ATP. At higher toluene concentrations, i.e. 5%, and longer periods of time in the presence of the solvent an inhibition of ATPase activity was noticed. Butyl acetate was 2.8 times more efficient that toluene and p-xylene had the weakest effect on the release of ATPase from *S. carlsbergensis* cells.

BIBLIOGRAFIE

1. H. J. PHAFF, în *The Yeasts*, vol. 2, sub red. A. H. ROSE, J. S. HARRISON, Academic Press, London—New York, 1971, p. 136.
2. A. TZAGOLOFF, J. biol. Chem., **244**, 5020 (1969).
3. VL. GHEORDUNESCU, date personale.
4. S. BARTNICKI-GARCIA, I. McMURROUGH, în *The Yeasts*, vol. 2, sub red. A. H. ROSE, J. S. HARRISON, Academic Press, London—New York, 1971, p. 444.

5. K. HUNTER, A. H. ROSE, în *The Yeasts*, vol. 2, sub red. A. H. ROSE, J. S. HARRISON, Academic Press, London—New York, 1971, p. 261.
6. CORINA MIHAIL, CECILIA MOTAŞ, Rev. roum. Biochim., **15**, 129 (1978).
7. H. SUOMALAINEN, E. OURA, în *The Yeasts*, vol. 2, sub red. A. H. ROSE, J. S. HARRISON, Academic Press, London—New York, 1971, p. 57.
8. A. H. BOULTON, Exp. Cell Res., **37**, 343 (1965).
9. T. NURMINEN, E. OURA, H. SUOMALAINEN, Biochem. J., **116**, 61 (1970).
10. A. TZAGOLOFF, J. biol. Chem., **244**, 5027 (1969).
11. H. R. MAHLER, E. H. CORDES, *Biological Chemistry*, ed. a 2-a, Harper & Row Publishers, New York—Evanston—San Francisco—London, 1971, p. 459.
12. S. HULEA, date personale.
13. S. V. PERRY, în *Methods in Enzymology*, vol. 2, sub red. S. COLOWICK, N. O. KAPLAN, Academic Press, New York, 1955, p. 582.
14. C. FISKE, Y. SUBBAROW, J. biol. Chem., **66**, 275 (1925).
15. M. KUNITZ, în *Methods of Enzymatic Analysis*, ed. a 2-a, Verlag Chemie, Academic Press, New York—London, 1956, p. 811.
16. D. G. AHEARN et al., în *The Yeasts*, vol. 2, sub red. A. H. ROSE, J. S. HARRISON, Academic Press, London—New York, 1971, p. 56.
17. D. OANCEA, date personale.

FOSFATAZA ACIDĂ LIZOZOMALĂ ÎN ŞOCUL TOXICO-SEPTIC

MARIA GREABU

Rezumat. S-a studiat nivelul activităţii fosfatazei acide pe lizozomii separaţi din ţesuturile hepatice şi renale la şobolanii cu şoc toxico-septic.
Prelevarea s-a realizat la 6, 12, 24 şi 36 de ore după inducerea şocului. Concomitent se determină şi nivelul plasmatic al fosfatazei acide. După 24 de ore se constată invadarea masivă a plasmei cu fosfatază acidă şi reduceri ale nivelului enzimatic din sedimentul lizozomal.
Ficatul pierde cu uşurinţă enzimele lizozomale, comparativ cu rinichiul, care le eliberează în cantităţi mai mici, reţinîndu-le parţial în cursul şocului.

Dintre multiplele consecinţe fiziopatologice ale şocului, modificările lizozomale se numără printre cele mai importante în toate formele de şoc. Diferitele forme de şoc au baze patomecanice comune, una din acestea constituind activarea hidrolazelor şi proteazelor lizozomale (1), (2).

În funcţie de severitatea şocului, membranele lizozomale se dilată şi se rup, enzimele pătrund în citosol, afectînd organitele (3).

În şocul toxico-septic, endotoxinele acţionează precoce şi direct asupra celulelor, rezultînd insuficienţa primară a celulei. Distrugerea infrastructurală şi tulburarea funcţională a celulelor sub acţiunea toxinelor sînt defecţiuni primare în şocul toxico-septic, în timp ce modificarea hemodinamică este secundară (4).

Pornind de la date din literatură referitoare la modificările celulare în şoc şi continuînd cercetări mai vechi cu privire la ficat şi rinichi în şocul traumatic şi operator (5), (6), (7), (8), ne-am propus să abordăm activitatea lizozomală la nivelul ficatului şi rinichiului în şocul toxico-septic.

MATERIAL ŞI METODE

Şocul toxico-septic s-a efectuat la şobolani Wistar prin ligatura intestinului la nivel supracecal, sub anestezie generală, fără respectarea condiţiilor de asepsie. Modelul experimental a fost realizat de prof. R. Barbu.

Sacrificările s-au efectuat la 6, 12, 24 şi 36 de ore de la intervenţia chirurgicală, prin decapitare, recoltîndu-se sînge şi fragmente de ţesut hepatic şi renal.

Lizozomii au fost izolaţi după tehnica descrisă de Maunsbach în soluţie de sucroză 0,25 M (9). Separarea lizozomilor s-a realizat prin centrifugarea fracţionată la 21 000 g a omogenatelor, după ce au fost eliberate de nuclei şi mitocondrii.

Identificarea lizozomilor s-a bazat pe un criteriu biochimic: demonstrarea stării de latenţă a hidrolazelor prin determinarea activităţii acestora (fosfataza acidă) în urma acţiunii unor agenţi care alterează membrana lizozomală, în experienţele de faţă prin procese de îngheţ—dezgheţ.

Determinarea activităţii fosfatazei acide în omogenatul total, lizozomi şi plasmă s-a bazat pe măsurarea fenolftaleinei, eliberată sub acţiunea hidrolitică a fosfatazei acide din fenolftalein-difosfat la pH 5,4 timp de o oră la 37°C (10).

St. cerc. biochim., 26, 2, 124—128 (1983)

Peroxizii lipidici au fost determinați prin reacția dintre malondialdehidă, un produs de descompunere al peroxizilor, și acidul tiobarbituric (11), (12).

Proteinele s-au dozat prin metoda colorimetrică cu reactivul Folin-Ciocîlteu (13).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Din analiza rezultatelor obținute rezultă că în șocul toxico-septic lizozomii hepatici sînt afectați precoce și intens (fig. 1, *b*). Endotoxinele au o inserție selectivă pe sistemul reticulo-endotelial hepatic (3). Numeroase cercetări (7), (8), (14), (15) evidențiază o mare sensibilitate a masei

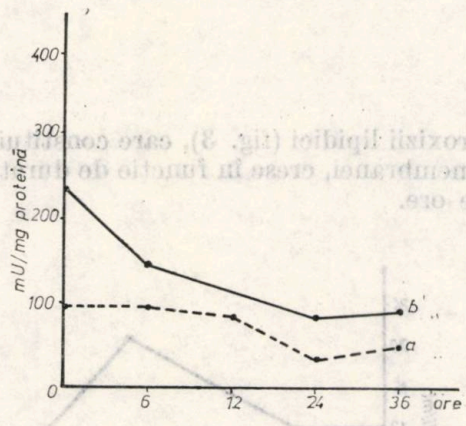


Fig. 1. — Activitatea fosfatazei acide în omogenatul total hepatic (*a*) și în lizozomii hepatici (*b*) în funcție de durata șocului.

celulare hepatice față de șoc datorită funcțiilor metabolice multiple pe care le îndeplinește prin dualitatea hepatocit—celule reticulo-histocitare.

La 6 ore după intervenția chirurgicală are loc o reducere a activității fosfatazei acide lizozomale în ficat, atingînd maximum la 24 de ore. Celulele hepatice suprasolicitate în șoc, prin exagerarea proceselor metabolice și a funcției de detoxifiere, pierd enzimele pe care le conțin. Această eliminare de enzime constituie cauza modificărilor ireversibile ale caracteristicilor celulare din șoc.

Mecanismele teoretice justifică aceste modificări prin afectarea directă a permeabilității membranei lizozomale (1), (2). În cazul șocului toxico-septic s-a dovedit (14), (15) că activarea intracelulară a enzimelor lizozomale joacă un rol primordial.

În condiții fiziologice, membrana lizozomală constituie o barieră lipoproteică ce împiedică ieșirea exagerată a hidrolazelor (16). Acest mecanism este subliniat la lizozomi de studii recente (17), care arată că, în timpul turnoverului membranei lizozomale hepatice, lizozomii pot degrada o parte din propria membrană, asigurînd în același timp ca enzimele lizozomale să nu fie eliberate.

În contextul pierderii fosfatazei acide la nivelul țesutului hepatic, activitatea fosfatazei acide în plasmă crește, atingînd valoarea maximă

la 24 de ore (fig. 2). Permeabilizarea membranei lizozomale permite deversarea hidrolazelor active în interiorul celulei sau în circulaţie, cauzînd „antemortum autolysis" (4), (14), (15).

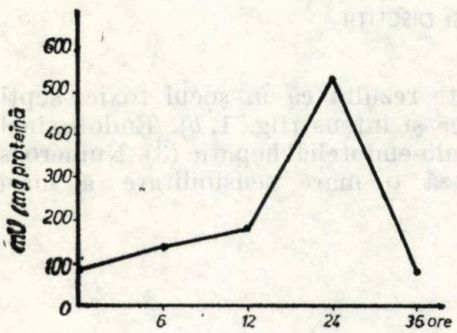


Fig. 2. — Activitatea fosfatazei acide în plasmă în funcţie de durata şocului.

Experimental se constată că peroxizii lipidici (fig. 3), care constituie o măsură a integrităţii structurale a membranei, cresc în funcţie de durata şocului, atingînd maximum la 24 de ore.

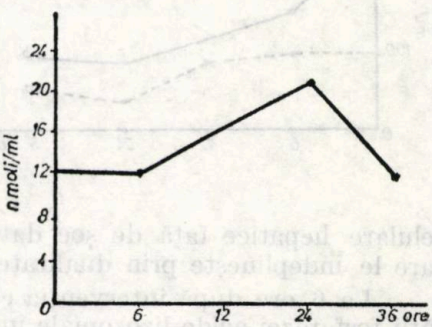


Fig. 3. — Peroxizii lipidici plasmatici în funcţie de durata şocului.

Modificările tipice care atrag atenţia asupra disrupţiei lizozomale în timpul stărilor de hipoxie sînt: pierderea masivă de enzime ale diferitelor organe (1), (2), (3), creşterea activităţii enzimatice a serului (14), (15) şi modificări morfopatologice (3), (5).

Rinichiul are o comportare diferită în cursul şocului toxico-septic (fig. 4). În acord cu datele din literatură (3), datele biochimice obţinute relevă că rinichiul reţine veziculele hidrolazice, împiedicînd eliminarea enzimelor. Mai mult, în timpul şocului toxico-septic se pare că el se îmbogăţeşte în vezicule hidrolazice, fenomen evidenţiat de o creştere marcantă a activităţii fosfatazei acide lizozomale renale (fig. 4, *b*).

Explicaţia acestei comportări diferite ar sta în însăşi individualitatea sistemului său lizozomal. Studii citate de Maunsbach (18) sugerează că lizozomii renali conţin un component specific şi puternic acid, care posedă proprietatea de a lega substanţe cationice şi lipofilice. Importanţa biologică a acestui component nu a fost pe deplin elucidată, dar s-a sugerat că

acesta conferă lizozomilor renali capacitatea de a proteja citoplasma de toxine.

Comparînd activitatea fosfatazei acide în omogenatele totale şi lizozomi la ţesuturile investigate (fig. 1 şi 4), se constată că în şoc au loc

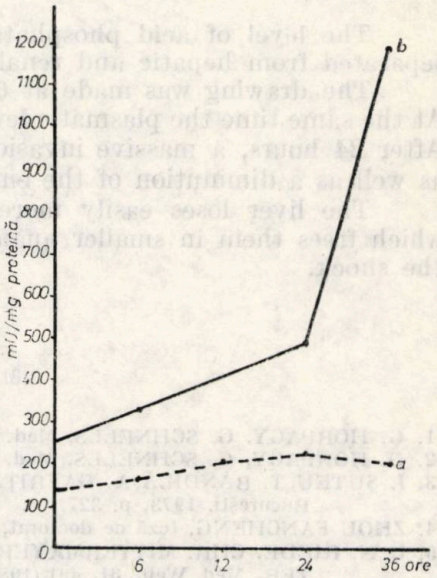


Fig. 4. — Activitatea fosfatazei acide în omogenatul total renal (*a*) şi în lizozomii renali (*b*) în funcţie de durata şocului.

modificări semnificative ale activităţii fosfatazei acide lizozomale, ceea ce pledează în favoarea ideii că în şoc sînt afectaţi lizozomii.

Au fost făcute şi determinări histochimice ale fosfatazei acide în ficat şi rinichi, rezultatele obţinute fiind în acord cu datele biochimice prezentate.

CONCLUZII

1. În şocul toxico-septic au loc modificări ale lizozomilor în funcţie de durata lui, modificări ce pot fi evidenţiate biochimic urmărind în timpul şocului un marker enzimatic lizozomal (fosfataza acidă).

2. Activitatea fosfatazei acide plasmatice şi peroxizii lipidici constituie un test de mare sensibilitate în aprecierea evoluţiei şocului toxico-septic.

3. În şocul toxico-septic, analizînd comportările ficatului şi rinichiului, rezultă că ficatul este organul afectat precoce şi intens.

Doresc să mulţumesc tov. prof. dr. doc. R. Barbu pentru iniţierea în acest domeniu şi pentru îndrumarea competentă pe parcursul efectuării acestei lucrări, care a fost efectuată în cadrul Disciplinei de fiziopatologie, Spitalul clinic Municipal — Bucureşti.

Prezentat la redacţie
la 31 mai 1983

Disciplina de fiziopatologie,
Spitalul clinic Municipal— Bucureşti

LYSOSOMAL ACID PHOSPHATASE IN THE ENDOTOXIN SHOCK

SUMMARY

The level of acid phosphatase activity was studied on lysosomes separated from hepatic and renal tissues at rats with endotoxin shock. The drawing was made at 6, 12, 24 and 36 hours after the shock. At the same time the plasmatic level of acid phosphatase was determined. After 24 hours, a massive invasion of the plasma with acid phosphatase as well as a diminution of the enzymatic level in lysosomes were found.

The liver loses easily more lysosomal enzymes than the kidney, which frees them in smaller quantities and partially keeps them during the shock.

BIBLIOGRAFIE

1. G. HORPACY, G. SCHNELLS, Med. Welt, **31**, 1820 (1980).
2. G. HORPACY, G. SCHNELLS, Med. Welt, **31**, 1859 (1980).
3. I. ŞUTEU, T. BĂNDILĂ, A. GAFRIŢĂ, A. BUCUR, V. CÂNDEA, *Şocul*, Edit. militară, Bucureşti, 1973, p. 327.
4. ZHOU FANCHENG, teză de doctorat, Spitalul militar, Bucureşti, 1982.
5. U. N. RIEDE, CHR. MITTERMAYER, R. HORN, H. FRIEDBURG, W. SANDRITTER, Med. Welt, **31**, 491 (1980).
6. N. NAGASUE, K. INOKUCHI, R. KADNASHIMA, M. KOBAYASHI, Surg. Gynec. Obstet., **149**, 173 (1979).
7. K. MORI, K. TAKAGI, M. MAENO, M. ACAGI, Surg. Gynec. Obstet., **152**, 427 (1981).
8. C. CALOGHERA, D. BORDOŞ, D. DRUGARIU, E. BERGER, A. TIROCH, I. DAN, Chirurgia, **XX** *(8)*, 755 (1971).
9. A. B. MAUNSBACH, în *Methods in enzymology, biomembranes*, part A, vol. 31, Academic Press, New York, 1974, p. 330.
10. S. VIERU, D. ŞANDRU, S. COMOROŞAN, *Investigaţii moderne în biochimie*, I.M.F.-Bucureşti, 1970, p. 341.
11. K. STATOH, Clin. Chim. Acta, **90**, 37 (1978).
12. R. OLINESCU, *Peroxidarea în chimie, biologie şi medicină*, Edit. ştiinţifică şi enciclopedică, Bucureşti, 1982, p. 231.
13. O. H. LOWRY, N. J. ROSENBROUGH, A. L. FARR, R. J. RANDALL, J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951).
14. A. JANOFF, G. WEISSMANN, B. W. ZWEIFACH, L. THOMAS, J. exp. Med., **116**, 451 (1962).
15. G. WEISSMANN, L. THOMAS, J. exp. Med., **116**, 433 (1962).
16. M. IONESCU-VARO, GH. DIMITRIU, C. DEDIU, *Biologie celulară*, Edit. didactică şi pedagogică, Bucureşti, 1981, p. 145.
17. L. JAECKEN, D. THINES-SEMPOUX, Cell. Biol. Internat. Rep., **5** (1981).
18. A. B. MAUNSBACH, în *International review of physiology, kidney and urinary tract physiology, II*, vol. 11, University Park Press, Baltimore, 1976.

SELECTAREA UNEI TULPINI DE *ASPERGILLUS NIGER* ÎNALT PRODUCĂTOARE DE GLUCOZOXIDAZĂ ÎN VEDEREA PURIFICĂRII ȘI IMOBILIZĂRII ENZIMEI PE O MEMBRANĂ DE COLAGEN (nota I)

IRINA ZAMFIRESCU, IOANA GOMOIU, OFELIA GOZIA, JEANA CIOPRAGA, HORST D. SCHELL

Rezumat. Au fost testate 30 de tulpini de *Aspergillus niger* și *Penicillium* sp. în vederea selectării unei tulpini înalt producătoare de glucozoxidază. Prin purificarea glucozoxidazei din tulpina de *A. niger* selectată, s-a obținut un preparat enzimatic cu o activitate de 1657 μg glucoză/min/mg proteină și un conținut proteic de 0,07 mg/ml.

Glucozoxidaza (GOD) (EC 1.1.3.4) catalizează oxidarea glucozei la acid gluconic și apă oxigenată, conform reacției:

$$\text{glucoză} + O_2 \xrightarrow{\text{GOD}} \text{acid gluconic} + H_2O_2$$

Evidențiată prima dată de Maximov (1904) în extractul obținut din miceliul ciupercii *A. niger*, această enzimă a fost studiată ulterior de Müller (1928—1931), care o denumește glucozoxidază. În 1937, Franke și Lorentz au reușit să obțină un preparat de glucozoxidază din ciupercile *A. niger* și *Penicillium glaucum*, cu o activitate de 80 de ori mai mare decît cea izolată de Müller (1), (2). După anul 1940 s-a reluat studiul enzimei, GOD fiind evidențiată ca antibiotic secundar în procesele de biosinteză a penicilinei (3), (4), (5).

Studiile efectuate de Munk și colab. (6) asupra GOD din *A. niger* au arătat că enzima produsă de acest fung este intracelulară, spre deosebire de cea produsă de speciile genului *Penicillium*, care, datorită capacității lor de a se autoliza rapid, eliberează GOD în mediul de cultură

Din cercetările efectuate în ultimii ani cu privire la GOD rezultă că microorganismele cu aplicabilitate în industria de biosinteză aparțin genurilor *Aspergillus* și *Penicillium*. Astfel, tulpinile industriale utilizate în producerea de GOD sînt: *A. niger* în S.U.A., *P. amagasakiense* în Japonia, *P. vitale* în U.R.S.S.

În lucrarea de față ne-am propus selectarea unei tulpini de *A. niger* înalt producătoare de GOD, în vederea imobilizării acestei enzime pe o membrană de colagen și a caracterizării preparatului imobilizat obținut.

St. cerc. biochim., 26, 2, 129—134 (1983)

MATERIAL ŞI METODE

În scopul selectării unei tulpini de *A. niger* înalt producătoare de GOD, s-au testat 30 de tulpini din colecţia Laboratorului de microbiologie al ISBB. Cultivarea tulpinilor s-a făcut în baloane Erlenmeyer de 750 ml, în condiţii de agitare continuă, timpul de incubare fiind de 76 de ore. Ca inocul s-a utilizat o cultură în vîrstă de 7 zile, obţinută pe cartof-agar.

Primul mediu de cultură utilizat a fost mediul Czapek cu 50 % glucoză. Tulpinile cu activitatea glucozoxidazică cea mai ridicată au fost inoculate în continuare pe cinci medii nutritive diferite, în vederea stabilirii mediului optim de producere intensivă a GOD. Mediile de cultură au fost următoarele :

— *mediul 1* (Munk şi Paskova) (6) : glucoză 5 %, acid citric 0,075 %, $Ca(NO_3)_2$ 0,2 %, KH_2PO_4 0,025 g, $MgSO_4$ 0,025 g, KCl 0,025 %, $FeCl_3$ 0,001 %, pH 5—5,2 ;

— *mediul 2* (Munk şi Paskova) (6) : glucoză 5 %, acid citric 0,075 %, $Ca(NO_3)_2$ 1 %, KH_2PO_4 0,1 %, $FeCl_3$ 0,001 %, pH 4,0 ;

— *mediul 3* (Pokrovskaia) (7) : $NaNO_3$ 0,2 %, KH_2PO_4 0,1 %, $MgSO_4$ 0,05 %, KCl 0,5 %, glucoză 5 % ;

— *mediul 4* (Cereumova) (8) : zaharoză 6 %, $NaNO_3$ 0,9 %, KCl 0,55 %, KH_2PO_4 0,1 %, $MgSO_4$ 0,05 %, $FeSO_4$ 0,001 % ;

— *mediul 5* (Czapek) (9) : zaharoză 30 %, $NaNO_3$ 2 %, KH_2PO_4 1 %, KCl 0,5 %, $MgSO_4$ 0,5 %, $FeSO_4$ 0,01 %.

Dozarea activităţii GOD a fost determinată prin metoda Messer şi Dahlquist (10) : la 1 ml conţinînd 0,04 M glucoză (Merck, Darmstadt, R.F.Germania), 0,1 % o-dianisidină (Serva, Feinbiochemica, Heidelberg, R.F. Germania) şi 0,01 % peroxidază (Calbiochem, 843 U/mg) la pH 6,0 şi 25°C, se adaugă 1 ml soluţie enzimatică diluată adecvat. Amestecul este apoi incubat 15 min la 37°C, după care reacţia este stopată cu H_2SO_4 50 % şi probele se colorimetrează la 530 nm faţă de un martor alcătuit din reactivi.

Cantitatea de glucozoxidază s-a calculat dintr-o curbă etalon construită cu cantităţi cunoscute de glucoză. O unitate de activitate reprezintă 1 μg glucoză oxidată/min/mg proteină, la 37°C.

Concentraţia de proteină s-a determinat după metoda Lowry modificată de Miller (11).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Rezultatele primei experienţe, în care s-a urmărit selectarea tulpinilor de ciuperci în scopul reţinerii tulpinilor înalt producătoare de GOD, sînt cuprinse în tabela 1.

Tabela 1

Activitatea glucozoxidazică a diferitelor tulpini de *Aspergillus niger* şi *Penicillium* sp.

Tulpina	Proveniența	Activitatea glucozoxidazică (μg glucoză/min/ml)	Tulpina	Proveniența	Activitatea glucozoxidazică (μg glucoză/min/ml)
A. niger 1	izolată 1982	10	*A. niger* 132	colecţie	1,40
A. niger 2	izolată 1982	4	*A. niger* 154	colecţie	0,83
A. niger 3	izolată 1982	26,66	*A. niger* 206	colecţie	0,20
A. niger 4	izolată 1982	36,60	*A. niger* 210	colecţie	2,16
A. niger 5	izolată 1982	3,13	*A. niger* 211	colecţie	83,30
A. niger 6	izolată 1982	4	*A. niger* 223	colecţie	4,66
A. niger 7	izolată 1982	13,30	*A. niger* 40	colecţie	10
A. niger 8	izolată 1982	13,30	*A. niger* 86	colecţie	4,66
Penicillium sp.1	izolată 1982	20	*A. niger* CJ	colecţie	76,66
Penicillium sp.2	izolată 1982	66,60	*A. niger* SPC_1	colecţie	46,66
A. niger 11	colecţie	0,73	*A. niger* SV	colecţie	0,26
A. niger 18	colecţie	2,06	*A. niger* KS	colecţie	1,40
A. niger 67	colecţie	13,30	*A. niger* LS	colecţie	2,9
A. niger 79	colecţie	0,13	*A. niger* SC	colecţie	13,30
A. niger 121	colecţie	1,63	*A. niger* LP_1	colecţie	2,66

Din cele 30 de tulpini testate, 7 au prezentat o activitate GOD mai mare. Acestea au fost apoi inoculate și cultivate în aceleași condiții pe mediul Czapek, timp de 72 ore, la temperatura de 28°C. Rezultatele acestei experiențe sînt redate în tabela 2, din care se poate observa că

Tabela 2

Activitatea glucozoxidazică a unor tulpini de *Aspergillus niger* și *Penicillium* sp., cultivate pe mediul Czapek

Tulpina	Proveniența	Activitatea glucozoxidazică (μg glucoză/min/ml)
A. niger 3	izolat 1982	18,33
A. niger 4	izolat 1982	183,33
Penicillium sp.2	izolat 1982	120
A. niger 211	colecție	133,30
A. niger 223	colecție	31,60
A. niger CJ	colecție	108,30
A. niger SPC_1		88,33

doar trei tulpini de *A. niger* au fost reținute pentru experiențele următoare, avînd o activitate glucozoxidazică ridicată: *A. niger* 4, *A. niger* 211, *A. niger* CJ. În continuare, cele trei tulpini au fost inoculate pe mediile de cultură descrise anterior pentru a stabili mediul nutritiv optim. Rezultatele acestei experiențe sînt redate în tabela 3.

Tabela 3

Activitatea glucozoxidazică a trei tulpini de *A. niger* inoculate pe diferite medii nutritive

Tulpina	Mediile de fermentație				
	1	2	3	4	5
A. niger 4	20,0	33,0	266,6	233,3	75,0
A. niger 211	108,3	81,6	58,3	10,0	16,0
A. niger CJ	366,6	6,6	200,0	146,6	46,6

Pe baza acestor rezultate s-au reținut pentru experimentare doar două tulpini: *A. niger* 4 și *A. niger* CJ, care au fost inoculate pe mediile nutritive optime în două variante: una cu zaharoză și alta cu glucoză. Rezultatele obținute sînt prezentate în tabela 4. După cum se vede din tabelă, tulpina *A. niger* 4, inoculată pe mediul 3 + glucoză, s-a dovedit a fi înalt producătoare de glucozoxidază, drept care a fost folosită în continuare pentru obținerea și purificarea enzimei.

Purificarea GOD. Miceliul de *A. niger*, separat de lichidul de cultură prin filtrare, s-a uscat pe hîrtie de filtru și s-a mojarat apoi cu nisip de cuarț și apă bidistilată (1 g miceliu la 2 ml apă). Omogenatul obținut s-a înghețat 24 de ore, apoi s-a lăsat la extras timp de 24 de ore la 4°C,

după care s-a centrifugat 20 min la 12000 rotații/min. Supernatantul a reprezentat extractul proteic total, care a fost dializat 24 de ore față de apă bidistilată. În continuare, purificarea enzimei a decurs în două etape:

Tabela 4

Activitatea glucozoxidazică a două tulpini de *A. niger* cultivate pe medii nutritive optime, în două variante

Tulpina	Variantă mediu nutritiv	Activitatea glucozoxidazică (μg/min/ml)
A. niger 4	mediul 3 + glucoză	733,3
A. niger 4	mediul 3 + zaharoză	103,3
A. niger 4	mediul 4 + glucoză	263,3
A. niger 4	mediul 4 + zaharoză	263,3
A. niger CJ	mediul 1 + glucoză	12,3
A. niger CJ	mediul 1 + zaharoză	43,3
A. niger CJ	mediul 3 + glucoză	256,6
A. niger CJ	mediul 3 + zaharoză	266,6

a) precipitarea fracționată cu $(NH_4)_2SO_4$ între 65 și 95% saturație și dializă 24 de ore față de tampon acid acetic acetat 0,01 M, pH 4,5;

b) cromatografie pe o coloană de DEAE-celuloză (2 × 60 cm), echilibrată cu tampon acid acetic acetat 0,05 M, pH 4,5, colectîndu-se fracțiuni de cîte 5 ml la o viteză de scurgere de 20 ml/oră (fig. 1).

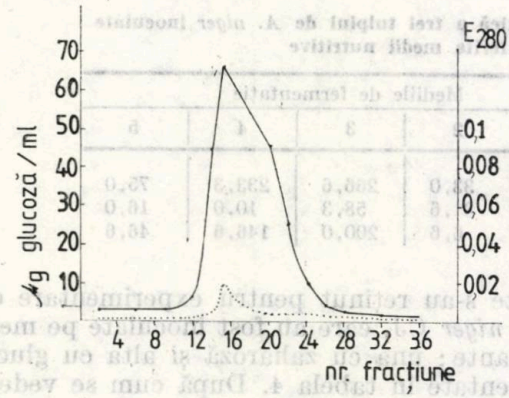


Fig. 1. — Eluția glucozoxidazei de pe o coloană de DEAE-celuloză.

Enzima nu a fost reținută pe coloană. Fracțiunile cu activitate maximă (nr. 8—16) au fost reținute și tratate cu $(NH_4)_2SO_4$ pînă la 90% saturație. Precipitatul obținut a fost reluat într-un volum minim de tampon fosfat 0,25 M, pH 6,0 și dializat față de același tampon. Rezultatele purificării sînt prezentate în tabela 5.

În urma purificării s-a obținut un preparat enzimatic cu o activitate de 1657 μg glucoză/min/mg proteină, un conținut proteic de 0,07 mg/ml și o activitate catalazică de 3,56 μmoli H_2O_2/min/mg proteină.

Tabela 5

Purificarea glucozoxidazei din *A. niger*

Etapa de purificare	Proteină (mg/ml)	Activitate specifică (mg glucoză/min/mg proteină)	Factor de purificare
Extract proteic total	0,84	75	1
Precipitare cu $(NH_4)_2SO_4$ 65—95%	0,15	1333	17,7
Cromatografie pe DEAE-celuloză	0,07	1657	22,1

CONCLUZII

1. Prin testarea a 30 de tulpini de *A. niger* și *Penicillium* sp., inoculate pe diferite medii nutritive, a fost selectată o tulpină de *A. niger* înalt producătoare de GOD.

2. Purificarea GOD din *A. niger* a dus la obținerea unui preparat enzimatic cu o activitate de 1657 μg glucoză/min/mg proteină, un conținut proteic de 0,07 mg/ml și o activitate catalazică de 3,56 μmoli H_2O_2/min/mg proteină.

3. Preparatul enzimatic de glucozoxidază s-a dovedit a fi rezistent în timp prin păstrare la 4°C.

Prezentat la redacție
la 31 mai 1983

Institutul de științe biologice
București, Splaiul Independenței nr. 296

AUSLESE EINES HOCHPRODUKTIVEN *ASPERGILLUS NIGER* STAMMES ZUR ERZIELUNG VON GLUKOSOXIDASE ZWECKS ISOLIERUNG UND TRÄGERFIXIERUNG DES ENZYMS AN KOLLAGENMEMBRANE

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden 30 Stämme von *Aspergillus niger* und *Penicillium* sp. zwecks Auslese eines hochproduktiven Stammes zur Erzielung von Glukosoxidase getestet. Das vom ausgewählten *A. niger* Stamm isolierte Glukosoxidasepräparat wies eine Aktivität von 1657 μg Glukose/min/mg Protein bei einem Proteingehalt von 0,07 mg/ml auf.

BIBLIOGRAFIE

1. V. I. BILAI, N. M. PIDOPLICIKO, *Antibiotic Mikrofid*, Sb. St. Izd. Ann., U.S.S.R.K., 1953, p. 44.
2. V. I. BILAI, N. M. PIDOPLICIKO, *Mikrofid i Ego Primenenie*, Sb. St. Izd. Ann., U.S.S.R.K., 1955, p. 5.
3. C. E. COULTHARDE, W. E. SHORT, R. MICHAELIS, Biochem. J., **39**, 24 (1945).
4. W. KOCHOLATY, Science, **97**, 186 (1943).
5. K. KUSAI, I. SEKUZU, R. HAGIHARA, K. OKUNUCHI, S. JAMACHI, M. NAKAI, Biochem. Biophys. Acta, **40**, 555 (1960).
6. V. MUNK, J. PASKOVA, J. HANUS, Folia Microbiol., **VIII**, 203 (1963).
7. V. N. POKROVSKAIA, L. M. NOVIKOVA, T. V. FINOGHENOVA, Mikrobiologhia, **XXXI**, 788 (1962).
8. T. A. CEREUMOVA, V. I. RODZEVICI, Farm. i sp. prom., **2**, 37 (1975).
9. ANA HULEA, *Ghid pentru laboratoarele de micologie şi bacteriologie*, Edit. agrosilvică, Bucureşti, 1969.
10. M. MESSER, A. DAHLQUIST, Anal. Biochem., **14**, 376 (1966).
11. G. L. MILLER, Analyt. Chem., **31**, 964 (1959).

OBȚINEREA UNUI PREPARAT IMOBILIZAT AL GLUCOZOXIDAZEI DIN *ASPERGILLUS NIGER* ȘI CARACTERIZAREA SA CATALITICĂ (nota II)

OFELIA GOZIA, JEANA CIOPRAGA, HORST D. SCHELL

Rezumat. Prin imobilizarea glucozoxidazei din *A. niger* pe o membrană de colagen s-a obținut un preparat imobilizat cu o activitate enzimatică de 84,3 μg glucoză/min/mg enzimă. Glucozoxidaza imobilizată nu își modifică pH-ul și temperatura optimă de acțiune, devenind însă mai termolabilă. În urma imobilizării, enzima își modifică afinitatea față de substrat, prezentînd o constantă Michaelis mai mare decît a enzimei libere. Enzima imobilizată este stabilă în timp și la folosiri repetate.

Lucrarea de față reprezintă o continuare a studiilor anterioare privind selectarea unei tulpini de *A. niger* înalt producătoare de glucozoxidază (GOD) (1).

Studierea enzimelor sub formă imobilizată deschide noi perspective de aplicare a acestora atît în cercetarea științifică fundamentală, cît și în diferite domenii ale practicii.

În general, prin fixare pe suporturi insolubile, enzimele își păstrează nealterate proprietățile lor catalitice, dobîndind totodată o serie de proprietăți noi, avantajoase în comparație cu cele libere nelegate.

În lucrarea de față am folosit drept suport insolubil, în scopul imobilizării GOD, colagenul, material biologic care, prin proprietățile sale, oferă o serie de avantaje atît pentru imobilizări de enzime, cît și pentru celule întregi de microorganisme (2), (3), (4).

Reacția de cuplare a enzimelor pe membrane de colagen este simplă, are loc în condiții blînde, ceea ce previne inactivarea enzimei în timpul cuplării.

MATERIAL ȘI METODE

Determinarea activității GOD libere s-a făcut după metoda descrisă de Messer și Dahlquist (5).

Imobilizarea glucozoxidazei prin legare covalentă de o membrană de colagen. Membrana de colagen, îmbibată în prealabil cu o soluție diluată de NaOH și spălată apoi la neutru, se tratează cu carbodiimidă (clorhidrat de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil))) (EDC) dizolvată în soluția enzimatică, lăsînd amestecul de reacție să stea peste noapte la 4—5°C. Conjugatul enzimatic rezultat se spală apoi alternativ cu apă distilată și cu o soluție de NaCl 0,5 M, pînă la îndepărtarea completă a enzimei nelegate. Prin imobilizare s-a obținut un preparat enzimatic cu o activitate de 84,3 μg glucoză/min/mg proteină și un conținut proteic de 0,00253 mg proteină/cm^2.

Determinarea activității enzimei imobilizate s-a făcut în aceleași condiții ca la enzima liberă, cu excepția faptului că o-dianisidina s-a adăugat în mediu după îndepărtarea membranei de colagen.

Variaţia activităţii GOD libere şi imobilizate în funcţie de concentraţia substratului a fost urmărită folosindu-se ca substrat glucoza în următoarele concentraţii : 0,01 ; 0,02 ; 0,04 ; 0,06 ; 0,08 şi 0,1 M în tampon fosfat 0,25 M, pH 6,0.

Variaţia activităţii enzimei libere şi imobilizate în funcţie de pH-ul mediului de reacţie s-a studiat folosindu-se tampoane de acid acetic-acetat 0,2 M la următoarele pH-uri : 3,7 ; 4,5 ; 5,0 ; 5,6 şi tampoane de fosfat 0,2 M la pH-urile : 6,0 ; 6,4 ; 7,0 ; 7,4 ; 8,4.

Variaţia activităţii GOD libere şi imobilizate în funcţie de temperatura mediului de reacţie (a) **şi de temperatura de preincubare** (b) **:**

a) s-a determinat activitatea ambelor preparate enzimatice la temperaturile de 5, 15, 25, 37, 45, 55, 65, 75°C ;

b) preparatele enzimatice au fost preincubate la temperaturile de 45, 55, 65°C, timp de 5, 15, 30 şi 60 min. Menţionăm că în acest caz s-a folosit şi albumină serică bovină ca agent protector faţă de efectul denaturant al temperaturilor mai ridicate.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Efectul diferitelor concentraţii de glucoză asupra vitezei de reacţie a glucozoxidazei libere şi imobilizate este redat în figura 1.

Analizînd rezultatele obţinute, se poate constata că cele două preparate enzimatice prezintă o comportare asemănătoare, exprimată printr-o curbă Michaelis-Menten. Reprezentînd grafic valorile reciproce ale vitezei de reacţie (1/V) în funcţie de reciprocele concentraţiilor de substrat (1/S), se constată totodată că prin imobilizare enzima şi-a modificat afinitatea faţă de substrat. Astfel, în timp ce în cazul enzimei libere $K_m = 0{,}028$ M glucoză, pentru enzima imobilizată $K'_m = 0{,}035$ M glucoză.

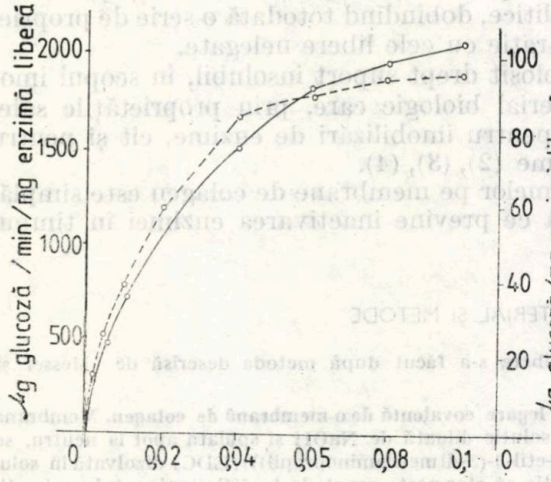


Fig. 1. — Efectul concentraţiei de substrat asupra activităţii glucozoxidazei libere (o ——— o) şi imobilizate (o— — —o).

Deoarece prin imobilizare pe suporturi insolubile enzimele îşi modifică în general conformaţia, şi afinitatea lor faţă de substrat poate suferi modificări. Aceste modificări ale constantelor Michaelis în cazul enzimelor imobilizate s-ar putea datora, pe de o parte, unor interacţiuni electrostatice dintre substrat şi suport sau unor efecte de difuzie limitată a substratului şi produsului, la şi de la enzima imobilizată pe suportul solid, ceea ce duce la constante Michaelis aparent diferite de cele ale enzimelor

libere. Concentrația substratului la nivelul enzimei fixate de suport devine mai scăzută decît în soluție, determinînd o creștere a constantei Michaelis, fapt constatat și în cazul altor enzime imobilizate pe suporturi de tip membrană (6), (7), (8).

Urmărindu-se influența variațiilor de pH asupra GOD libere și imobilizate (fig. 2), s-a constatat că prin imobilizare enzima nu își modifică

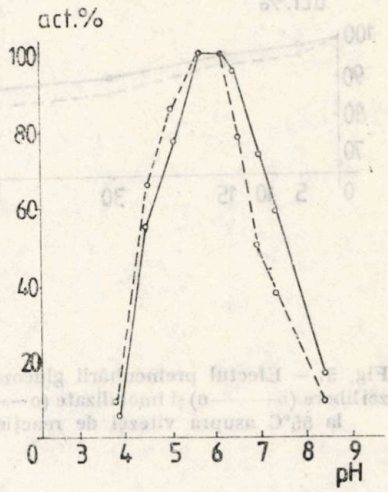


Fig. 2. — Efectul variațiilor de pH asupra activității glucozoxidazei libere (o———o) și imobilizate (o— — —o).

pH-ul optim. Ambele preparate enzimatice prezintă activități maxime în domeniul de pH 5,6—6,0. Faptul că enzima imobilizată nu își modifică pH-ul optim de acțiune s-ar putea datora sarcinii electrice aproximativ neutre a suportului pe care a fost imobilizată și faptului că, în urma acțiunii ei catalitice, nu se eliberează acizi sau baze.

Studiindu-se influența temperaturii asupra vitezei de reacție (fig. 3), s-a constatat că ambele preparate enzimatice prezintă o activitate maximă

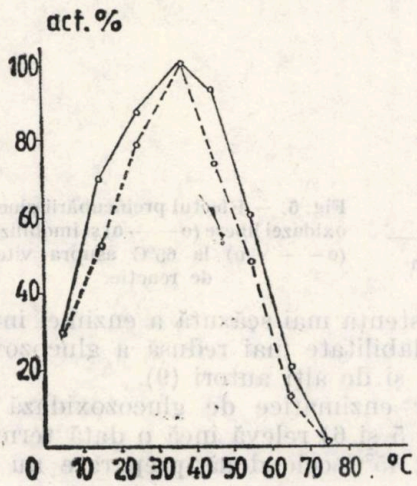


Fig. 3. — Efectul temperaturii asupra vitezei de reacție a glucozoxidazei libere (o———o) și imobilizate (o— — —o).

la 37°C. Se remarcă însă că, atît la temperaturile inferioare, cît şi la cele superioare valorii de 37°C, enzima liberă s-a dovedit a fi mai rezistentă decît cea imobilizată. Avînd în vedere că reacţia de dozare a activităţii GOD implică prezenţa unei a doua enzime (peroxidaza), care acţionează pe produsul de reacţie al glucozoxidazei, şi deoarece în cazul enzimelor imobilizate avem de-a face cu o difuzie limitată a produşilor de reacţie

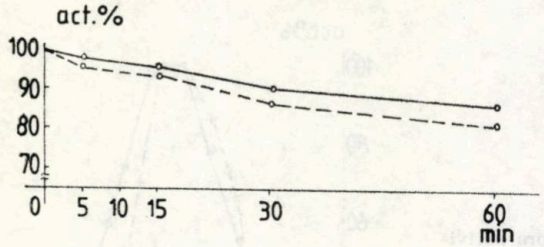


Fig. 4. — Efectul preincubării glucozoxidazei libere (o———o) şi imobilizate (o— — —o) la 45°C asupra vitezei de reacţie.

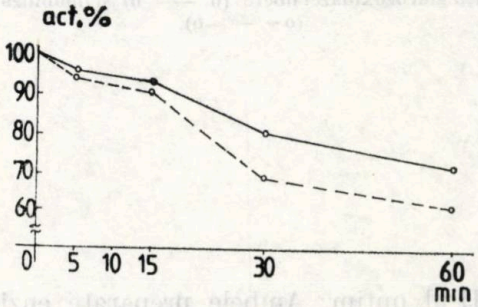


Fig. 5. — Efectul preincubării glucozoxidazei libere (o———o) şi imobilizate (o— — —o) la 55°C asupra vitezei de reacţie.

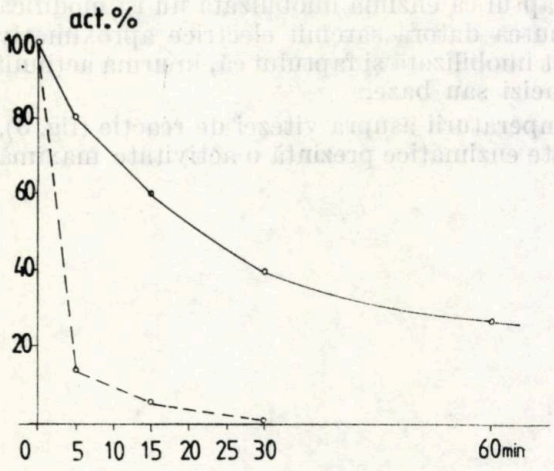


Fig. 6. — Efectul preincubării glucozoxidazei libere (o———o) şi imobilizate (o— — —o) la 65°C asupra vitezei de reacţie.

în mediu, aceasta ar putea explica rezistenţa mai scăzută a enzimei imobilizate faţă de temperatură. O termolabilitate mai redusă a glucozoxidazei imobilizate a putut fi constatată şi de alţi autori (9).

Efectul preincubării preparatelor enzimatice de glucozoxidază la temperaturile de 45, 55 şi 65°C (fig. 4, 5 şi 6) relevă încă o dată termolabilitatea enzimei imobilizate. Dacă la 45°C cele două preparate nu îşi

modifică prea mult activitatea pe parcursul celor 60 min, ele sînt considerabil afectate la temperaturile de 55 și 65°C. Astfel, la 55°C, deși enzima imobilizată este mai termolabilă comparativ cu cea liberă, scăderile procentuale ale activităților sînt relativ apropiate. De exemplu, după 60 min de preincubare la 55°C, enzima liberă a păstrat 72 % din activitate, în timp ce enzima imobilizată a menținut 61 %. La 65°C, temperatură la care enzima liberă a păstrat 47 % din activitatea prezentată la 37°C, enzima imobilizată și-a pierdut complet activitatea după 30 min de preincubare. Menționăm că, prin incubarea enzimei în prezență de ASB 0,1 %, nu s-a observat la nici una din temperaturile studiate un efect protector asupra preparatelor enzimatice.

Termolabilitatea enzimei imobilizate poate fi explicată prin natura proteică a suportului insolubil utilizat, constatîndu-se că menținerea suportului timp mai îndelungat la temperaturi ridicate duce la o micșorare a suprafeței acestuia.

Conjugatul enzimatic insolubil, deși nu este prea rezistent față de acțiunea denaturantă a temperaturilor ridicate, prezintă totuși o mare stabilitate în timp și poate fi folosit de multe ori fără o scădere apreciabilă a activității sale enzimatice.

CONCLUZII

1. Prin imobilizarea GOD pe o membrană de colagen s-a obținut un preparat imobilizat cu o activitate enzimatică de 84,3 μg glucoză/min/mg proteină și un conținut proteic de 0,00253 mg/cm².

2. În urma imobilizării, enzima își modifică afinitatea față de substrat, prezentînd o constantă Michaelis (0,035 M) mai mare decît a enzimei libere (0,028 M).

3. Prin imobilizare, GOD nu își modifică pH-ul și temperatura optimă de acțiune, devenind însă mai termolabilă.

4. Enzima imobilizată este stabilă în timp și rezistentă la folosiri repetate.

Prezentat la redacție
la 31 mai 1983

Institutul de științe biologice
București, Splaiul Independenței nr. 296

HERSTELLUNG EINES TRÄGERFIXIERTEN PRÄPARATES DER GLUKOSOXIDASE AUS *ASPERGILLUS NIGER* UND SEINE KATALYTISCHEN EIGENSCHAFTEN (II)

ZUSAMMENFASSUNG

Durch kovalente Bindung der aus *A. niger* erzielten Glukosoxidase an Kollagenmembrane wurde ein trägerfixiertes enzymatisch aktives Präparat mit einer Aktivität von 84,3 μg Glukose/min/mg Protein erhalten. Die trägergebundene Glukosoxidase behält ihr pH- und Temperaturop-

timum bei und wird gleichzeitig temperaturbeständiger. Als Folge der Bindung an den unlöslichen Träger verändert das Enzym seine Affinität gegenüber seinem Substrat und weist eine höhere Michaeliskonstante auf, als das freie Enzym. Das trägergebundene Enzym ist zeitbeständig und büßt auch nach zahlreichen Wiederverwendungen seine Aktivität nicht ein.

BIBLIOGRAFIE

1. IRINA ZAMFIRESCU, IOANA GOMOIU, OFELIA GOZIA, JEANA CIOPRAGA, HORST D. SCHELL, St. cerc. biochim., **26**, 2, 129 (1983).
2. HORST D. SCHELL, GABRIELA ANGEL, V. GOVOREANU, St. cerc. biochim., **26**, 63 (1983).
3. HORST D. SCHELL, OFELIA GOZIA, MARIA CALOIANU-IORDĂCHEL, VIORICA TRANDAFIR, invenţie în curs de brevetare, dosar OSIM 105261/1983.
4. HORST D. SCHELL, OFELIA GOZIA, Rev. roum. Biochim., **19**, 295 (1982).
5. M. MESSER, A. DAHLQUIST, Anal. Biochem., **14**, 376 (1966).
6. L. GOLDSTEIN, Y. LEVIN, E. KATCHALSKI, Biochemistry, **3**, 1913 (1964).
7. J. H. JULLIARD, C. GODINOT, D. L. GAUTHEUN, FEBS Letters, **14**, 185 (1971).
8. R. O. STASIN, H. D. BROWN, F. X. HASSELBERGER, Canad. J. Biochem., **48**, 1314 (1970).
9. A. B. PAULJUKONIS, D. P. JAUKAUSKANTE, A. A. DIKCJUVENE, V. G. MALINOVSKY, Prikl. Biohiym. Mikrobiol., **XVI**, 222 (1980).

CORELAȚII ÎNTRE ANEUPLOIDIE ȘI POLIMORFISMUL ENZIMATIC LA GRÎU

IOANA HAGIMA

Rezumat. Investigațiile s-au efectuat pe semințe de grîu monosomice și ditelosomice, cele privind peroxidaza prin electroforeză pe gel de agar, iar cele referitoare la fosfataza acidă prin electroforeză pe gel de poliacrilamidă. S-a relevat faptul că cromozomul 7D conține genele ce controlează biosinteza a două forme moleculare ale peroxidazei din endosperm. Cromozomul $4B^8$ conține genele ce intervin în codificarea a două forme moleculare ale fosfatazei acide, caracterizate prin mobilitatea electroforetică cea mai mare.

Monosomia la grîu (n-1 ; 2n-1) este un tip de aneuploidie caracterizat prin absența unui cromozom din garnitura cromozomială normală (1). Monosomicii sînt deosebit de utili amelioratorului în stabilirea cromozomilor purtători de gene vitale, valoroase, care urmează a fi transferate de la o specie la alta. Sears (citat de (2)) a reușit să obțină seria completă de monosomi pentru toți cei 21 de cromozomi ai setului haploid caracteristic grîului comun, soiul de primăvară Chinese Spring ($2n = 6x - 1 = 41$).

Ditelosomia oferă posibilitatea de a se preciza rolul genelor situate pe un anumit braț al unui cromozom, respectiv implicarea lor concretă într-un proces sau altul.

Studii legate de codificarea unor enzime la grîu au efectuat Jaaska (3), Hart (4), Kobrehel și Feillet (5), Auriau și colab. (6), Konzak (7), stabilind genoamele implicate în biosinteza lor. Relevăm și investigațiile menite să contureze polimorfismul enzimatic și tipurile de enzimograme în cadrul speciei hexaploide de grîu comun (8)—(10).

În această lucrare ne-am propus evidențierea unor corelații între prezența anumitor forme moleculare enzimatice ale peroxidazei și fosfatazei acide și codificarea lor genetică, folosind semințe de la plante monosomice. Subiectul lucrării se încadrează în preocupările actuale privind utilizarea izoenzimelor în marcarea cromozomilor la grîu, respectiv stabilirea conexiunilor dintre caracterele genetice și cele biochimice ale grîului relevate de polimorfismul enzimatic.

MATERIAL ȘI METODE

Investigațiile asupra peroxidazei s-au efectuat pe semințe din plantele monosomice 7 pentru cromozomul 7D al soiului Favorit-5. Probele au provenit de la ICCPT—Fundulea. S-a lucrat pe jumătatea de sămînță fără embrion, extrasă cu 0,2 ml soluție de clorură de sodiu 0,5 %. Probele s-au centrifugat la 3500 × g timp de 10 min. Supernatantul s-a amestecat cu gel de agar în raport 1 : 1 (v/v). Electroforeza s-a realizat în gel de agar 1,5 % (Agar Noble,

Difco Laboratories) pe plăci de sticlă de 10 × 15 cm, în tampon acid boric 0,2 M — borax 0,05 M, pH 8,2. Pentru revelarea benzilor cu activitate peroxidazică, plăcile s-au imersat în tampon acetat pH 4,8 saturat cu guaiacol și benzidină, apoi în soluție de apă oxigenată 0,03 %. Reacția enzimatică s-a oprit cu o soluție de acid acetic 20 %.

Pentru fosfataza acidă din ditelosomii de la soiul de grîu Chinese Spring, cercetările s-au realizat pe următoarele probe : $4A^S$, $4A^{RT}$, $4A^{LT}$, $4B^L$, $4D^\alpha$, $4D^{RT}$, lucrîndu-se tot pe cîte o jumătate de sămînță prelucrată ca mai sus, cu deosebirea că extracția și electroforeza s-au efectuat în tampon Tris-glicocol, pH 8,4. Pentru electroforeză s-a utilizat cîte 0,1 ml supernatant. Disc-electroforeza s-a realizat în gel de poliacrilamidă 7 %, drept catalizatori folosindu-se N, N, N′, N′-tetrametilen-diamina (temed) 0,15 % și persulfatul de amoniu 0,025 %, în tuburi de sticlă de 7,5 × 0,7 cm.

Formele moleculare multiple ale fosfatazei acide s-au evidențiat într-o soluție ce a conținut 1-naftilfosfat de sodiu 40 mg și Fast Garnet GBC 20 mg pentru 100 ml tampon acetat 0,5 M, pH 4,8. Reacția enzimatică s-a oprit cu o soluție de acid acetic 14 %. Fotografiile s-au obținut cu geluri uscate pentru peroxidază și cu geluri menținute în apă distilată pentru fosfataza acidă.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Kobrehel și Feillet (5), Auriau și colab. (6) au stabilit că în biosinteza peroxidazei sînt implicați cromozomii 7A, 4B și 7D. Într-un studiu cuprinzător privind controlul genetic al proteinelor din grîu, Konzak (7) a arătat că în biosinteza peroxidazei din diferite organe mai intervin și genele localizate pe cromozomii 1A(S), 1D(S), 2D, 2D(β), 3A, 3D, 5A(S), 6B. Alexandrescu și colab. (8), analizînd semințele de la 132 de soiuri și linii de grîu hexaploid, au demonstrat o însemnată variabilitate genetică a nouă fracțiuni peroxidazice, stabilind 15 tipuri de enzimograme. Totodată, autorii au făcut unele deducții asupra determinismului genetic al fracțiunilor enzimatice. Astfel au constatat că două dintre fracțiunile evidențiate (notate 4 și 6) sînt controlate de alelele aceleiași gene, aspect confirmat prin analiza semințelor unei populații hibride F_2, la care enzimogramele obținute relevă o segregare mendeleană.

În aceeași lucrare, la o formă de *Aegilops squarrosa* (considerat ca donor al genomului D la grîul hexaploid) s-a evidențiat prezența a două fracțiuni peroxidazice, și anume fracțiunile 3 și 6, care s-au regăsit și în grîul hexaploid. S-a mai precizat că fracțiunea 3 este specifică endospermului, iar fracțiunea 6 embrionului.

Pornind de la aceste rezultate, am aprofundat și extins cercetările noastre. Studiul nostru a urmărit conturarea unor relații genom—cromozomi—peroxidază, reliefate pe baza enzimogramelor obținute. Astfel, în figura 1, *a* și *b*, prezentăm două spectre electroforetice, care au fost comune pentru majoritatea endospermilor analizați. În regiunea de la start spre anod distingem o fracțiune peroxidazică, iar în regiunea de la start spre catod relevăm trei grupuri de fracțiuni cu mobilități electroforetice diferite. Așa cum reiese din figura 1, *c*, grupul dinspre catod este compus din două fracțiuni, dar, fiind intense ca activitate, se vizualizează ca una singură. Grupul cu mobilitate intermediară este alcătuit tot din două fracțiuni, vizibile în figura 1, *d*. Grupul situat sub start este reprezentat și el de două fracțiuni, diferite ca intensitate a activității (fig. 1, *e*).

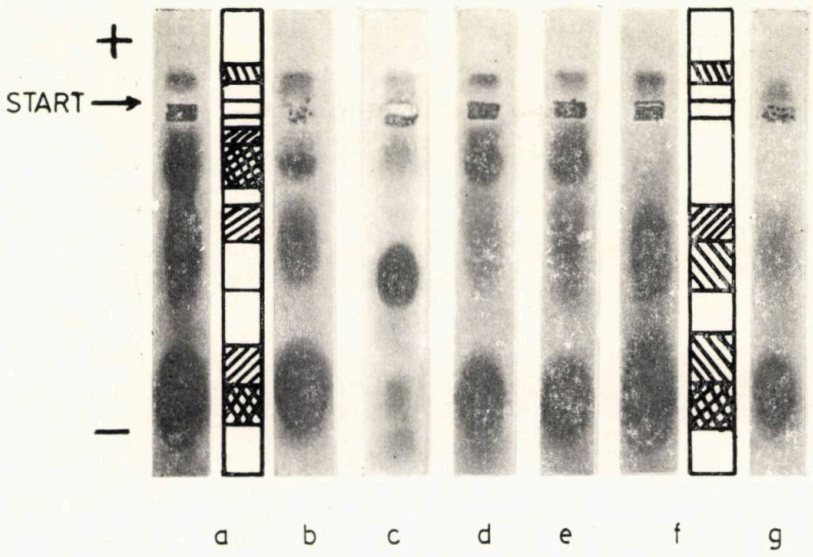


Fig. 1. — Enzimogramele peroxidazei în gel de agar aparținînd semințelor monosomice (*a*—*e*) și semințelor nulisomice (*f* și *g*).

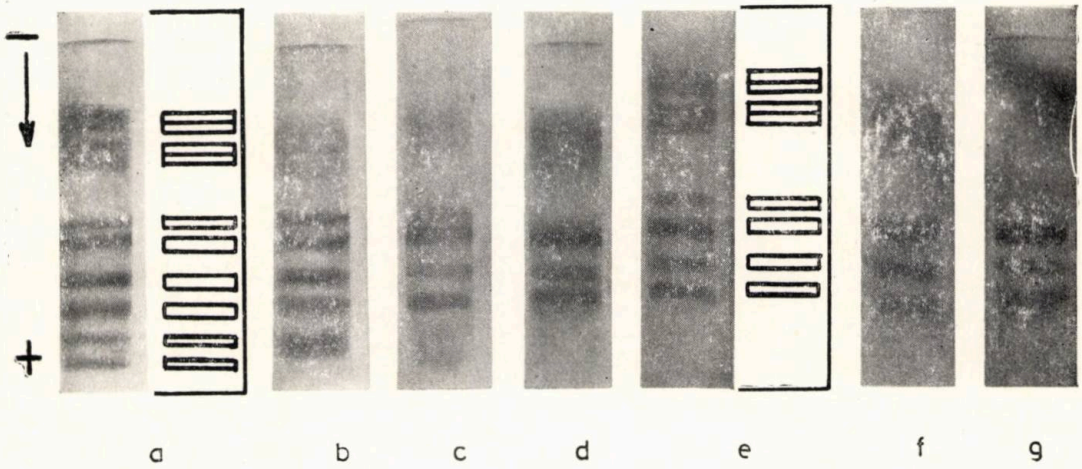


Fig. 2. — Enzimogramele fosfatazei acide în gel de poliacrilamidă aparținînd soiului Chinese Spring (*a*) și ditelosomilor: $4A^{S}$ (*b*); $4A^{RT}$ (*c*); $4A^{LT}$ (*d*); $4B^{L}$ (*e*); $4D^{z}$ (*f*) și $4D^{RT}$ (*g*).

Comparînd între ele spectrele electroforetice provenite de la monosomi, remarcăm faptul că am întîlnit și semințe nulisomice (fig. 1, *f* și *g*), întrucît se deosebesc evident de celelalte prin absența fracțiunilor enzimatice situate sub start. Din această constatare se degajă concluzia că monosomii 7D conțin genele implicate în biosinteza a două forme moleculare ale peroxidazei din endosperm. Constatarea nu s-a putut extinde și pentru fracțiunea peroxidazică 6, specifică embrionului, deoarece jumătatea de sămînță cu embrion a servit studiilor cariologice.

În evidențierea activității peroxidazice am utilizat două substraturi, din următorul considerent: în lucrarea deja citată (8), cele 15 tipuri de enzimograme s-au stabilit folosind ca substrat guaiacolul. Se știe însă că benzidina este un substrat mai sensibil, dar mai ușor oxidabil; această caracteristică determină în unele cazuri pierderea specificității benzilor. Folosind simultan în acest studiu calitativ al peroxidazei guaiacolul și benzidina, am beneficiat de specificitatea celui dintîi și de sensibilitatea acestuia din urmă.

A doua enzimă studiată în strînsă conexiune cu aspectele genetice ale grîului este fosfataza acidă (9)—(11). Studiile lui Hart (4) privind evoluția genelor din grîurile hexaploide au reliefat că în biosinteza fosfatazei acide sînt implicați cromozomii seriei omologe 4: 4A, 4B și 4D. Konzak (7) a relevat faptul că în biosinteza fosfatazei acide din diferite organe mai sînt implicate și genele aparținînd cromozomilor 2A(L), 3A(L), 6B(S) și 7D(L).

Un studiu electroforetic al fosfatazei acide din semințele a 93 de soiuri (9) a arătat că, spre deosebire de peroxidază, polimorfismul fosfatazei acide din semințe este mai puțin pronunțat; de aici reiese că la marea majoritate a soiurilor analizate baza genetică a acestei din urmă enzime este comună.

Prezenta lucrare a urmărit corelarea polimorfismului electroforetic al fosfatazei acide cu genele situate pe anumite brațe ale cromozomilor seriei omologe 4. Enzimogramele obținute de la ditelosomii testați au fost asemănătoare cu enzimograma soiului Chinese Spring (fig. 2, *a*), cu o singură excepție: proba $4B^{L}$. Acest ditelosom a prezentat o enzimogramă specifică prin aceea că nu s-au evidențiat cele două fracțiuni cu mobilitatea electroforetică cea mai mare (fig. 2, *a*). Dintr-o lucrare a lui Jaaska (3), efectuată pe specii de *Triticum* cu diferite grade de poliploidie, s-a desprins concluzia că în codificarea celor două fracțiuni rapide intervine genomul B. Hart (4), analizînd fosfataza acidă din tulpinile răsadurilor de Chinese Spring, a stabilit corelații privind controlul genetic al acestei enzime. Astfel s-au precizat genele structurale pentru anumite izoenzime, genele localizate pe brațele $4A^{\beta}$, 4BS și 4DL. Din investigațiile noastre a reieșit precizarea că genele localizate pe brațul $4B^{S}$ sînt implicate în biosinteza celor două forme moleculare ale fosfatazei acide cu mobilitatea cea mai mare, din sămînță. Această constatare exprimă o nouă ipostază a utilizării unei enzime în studiul amănunțit al garniturii cromozomiale la grîu.

Determinarea localizării pe cromozomi a genelor implicate în sinteza diferitelor fracțiuni peroxidazice sau fosfatazice alături de studiul înlănțuirii genelor ce controlează caractere de importanță economică se dovedește extrem de valoroasă. Aceste investigații ar putea furniza ameliorări

grîului un nou marker biochimic, caracterizat prin finețe și utilitate, la îndemîna cercetătorilor pentru accelerarea procesului de creare a unor genotipuri perfecționate.

CONCLUZII

1. Analizînd monosomi și nulisomi, am constatat că cromozomul 7D conține genele ce controlează biosinteza a două forme moleculare ale peroxidazei din endosperm.

2. Pe brațul $4B^8$ sînt localizate genele implicate în biosinteza a două forme moleculare multiple ale fosfatazei acide, cele mai rapide din spectrul seminței de grîu hexaploid.

Prezentat la redacție
la 5 aprilie 1983

ICCPT — Fundulea,
Colectivul de biochimie,
București, Bd. Mărăști nr. 61

THE RELATIONSHIPS BETWEEN ANEUPLOIDY AND ENZYMATIC POLYMORPHISM IN WHEAT

SUMMARY

Studies on monosomic and ditelosomic wheat seeds were performed by agar gel electrophoresis for peroxidase and by polyacrylamide gel electrophoresis for acid phosphatase. It has been revealed that 7D chromosome contains the genes controlling the biosynthesis of two peroxidase molecular forms in the endosperm. The $4B^8$ chromosome contains the genes involved in the codification of two acid phosphatase molecular forms, exhibiting the highest electrophoretic mobility.

BIBLIOGRAFIE

1. N. GIOSAN, N. N. SĂULESCU, *Principii de genetică*, Edit. Ceres, București, 1972, p. 265.
2. I. ANGHEL, N. TOMA, *Poliploidia și aneuploidia*, Edit. științifică și enciclopedică, București, 1980, p. 101.
3. V. JAASKA, Izv. Akad. Nauk Est. S.S.R., **XVIII**, Biologhia, **2**, 170 (1969).
4. G. E. HART, Proc. IVth Int. Wheat Genetic Symposium, Columbia, Missouri, 1973, p. 805.
5. K. KOBREHEL, P. FEILLET, Canad. J. Bot., **53**, 2336 (1975).
6. P. AURIAU, J. C. AUTRAN, L. CHARBONNIER, G. DOUSSINAULT, Ann. Amélior. Plantes, **26**, 51 (1976).
7. C. F. KONZAK, Adv. Genet., **19**, 408 (1977).
8. V. ALEXANDRESCU, I. HAGIMA, N. N. SĂULESCU, Rev. roum. Biochim., **16**, 167 (1979).
9. I. HAGIMA, N. N. SĂULESCU, Rev. roum. Biochim., **19**, 209 (1982).
10. V. ALEXANDRESCU, N. N. SĂULESCU, Rev. roum. Biochim., **19**, 93 (1982).
11. I. HAGIMA, S. NICOLAE, Rev. roum. Biochim., **18**, 21 (1981).

DINAMICA UNOR ACTIVITĂȚI ENZIMATICE LA PRODUCĂTORUL DE LIZINĂ *CORYNEBACTERIUM MELASSECOLA* CULTIVAT ÎN CONDIȚII DIFERITE DE MEDIU

MAGDALENA LUNGU *, ANCA ROȘEANU *, ELENA SĂSĂRMAN **, ANA IONIȚĂ **, ȘTEFANA JURCOANE **, SILVIA HORIȚĂ **

Rezumat. Celulele de *Corynebacterium melassecola* s-au cultivat în condiții de mediu mai puțin favorabile, cînd o parte din extractul de porumb, principala sursă de azot pentru microorganism, a fost înlocuită cu hidrolizat de drojdie furajeră, hidrolizat de turtă proteică și hidrolizat de soia. Efectele înlocuirii extractului de porumb s-au urmărit la nivelul dehidrogenazelor totale, succinatdehidrogenazelor și aspartatkinazei, dinamica acestor enzime fiind modificată în comparație cu mediul martor, care conținea extract de porumb în totalitate. Modificările dinamicii acestor enzime s-au oglindit în producția finală de lizină, aceasta fiind optimă pentru extractul de porumb și hidrolizatul de drojdie, urmînd, în ordinea descrescătoare a cantității de lizină, hidrolizatul de soia și hidrolizatul de turtă proteică.

Tulpina *Corynebacterium* prezintă o particularitate biochimică cu consecințe practice importante prin faptul că, în anumite condiții, metabolismul său poate fi dirijat în sensul biosintezei preferențiale a lizinei și al acumulării acesteia în mediul de cultură.

Lizina face parte dintre aminoacizii esențiali a căror prezență în hrana animalelor, în cantități sporite, crește valoarea nutritivă a acesteia.

Obținerea pe scară industrială a aminoacizilor prin fermentație microbiană se bazează pe obținerea mutanților auxotrofi dependenți de homoserină sau a mutanților dublu auxotrofi dependenți de metionină și treonină (1).

Dacă ne referim la schema de biosinteză a lizinei, enzima cheie în acest proces este β-aspartatkinaza (β-AK), care catalizează formarea β-aspartilfosfatului și a semialdehidei acidului aspartic, principalii precursori ai l-lizinei (fig. 1) (2). Această enzimă este inhibată de acțiunea simultană a lizinei și treoninei, ceea ce determină folosirea mutanților auxotrofi menționați. La acești mutanți este blocată calea de biosinteză a homoserinei și treoninei, fapt ce favorizează biosinteza lizinei plecînd de la acidul aspartic, principalul precursor al acesteia (fig. 1) (2).

Lizina intracelulară, cînd depășește anumite concentrații, are un efect inhibitor (inhibiție prin produs final) asupra β-AK. Pentru a înlătura această inhibiție au fost selectați mutanții auxotrofi la care situsul allosteric al enzimei este inactivat (enzime dereglate). Prin combinarea celor două tehnici de obținere a mutanților dublu auxotrofi și a mutanților cu enzime dereglate (situsul allosteric inactiv), acumularea lizinei în mediu poate să ajungă pînă la 50 g la litru.

Condiţiile de mediu şi tehnologie nou create trebuie corelate cu celelalte procese biosintetice şi energetice ale celulei: glicoliza, ciclul acizilor tricarboxilici (CAT).

Studiile efectuate anterior (5), precum şi unele date din literatură au arătat că există o legătură între activitatea dehidrogenazică totală

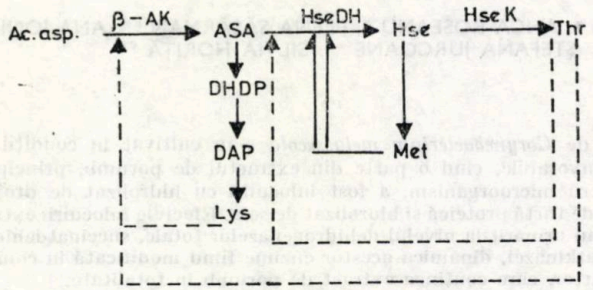


Fig. 1. — Schema de biosinteză a lizinei.

Ac. asp	— acid aspartic
β-AK	— β-aspartatkinază
ASA	— semialdehida acidului aspartic
HseDH	— homoserindehidrogenază
Hse	— homoserină
HseK	— homoserinkinază
Thr	— treonină
Met	— metionină
DHDP	— dihidrodipicolinat
DAP	— acid diaminopimelic
Lys	— lizină
⟶	reacţia enzimatică
⟶	represie
⟶	
⇢	inhibiţie prin produs final

(DH), succinatdehidrogenazică (SDH) şi cantitatea de lizină sintetizată de celulă (3), (4).

În lucrarea de faţă, bazîndu-ne pe corelaţiile găsite anterior care se refereau la activităţile DH, SDH, AK şi la cantitatea de lizină produsă de microorganism, am determinat aceste activităţi enzimatice în celulele de *Corynebacterium* ICCF-16 în fază de fermentaţie, cultivate pe medie cu înlocuitori ai extractului de porumb, acesta fiind principala sursă de azot a microorganismului. Înlocuitorii testaţi de noi în aceste experienţe au fost hidrolizatul de drojdie furajeră, hidrolizatul de turtă proteică şi hidrolizatul de şrot de soia.

MATERIAL ŞI METODE

Pregătirea probelor s-a efectuat după cum s-a descris într-o lucrare anterioară (5).

Determinarea activităţilor enzimatice. Activitatea dehidrogenazică totală şi activitatea succinatdehidrogenazică s-au bazat pe metoda elaborată de Kun şi Abood (6).

Activitatea β-aspartatkinazei (β-AK) s-a determinat conform metodei lui Black şi Wighet (7), cu unele modificări (5).

Concentrația proteică s-a determinat prin metoda biuretului, modificată pentru sisteme impure de Koch și Putnam (8).

Lizina a fost determinată prin cromatografie pe hîrtie (Fișa analitică ICCF).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Dinamica DH, SDH, AK la fermentații obținute cu hidrolizat de drojdie furajeră. Inoculul de *Corynebacterium melassecola* cultivat în laborator timp de 12 ore, ceea ce reprezintă vîrsta optimă de creștere, a fost trecut în mediul de fermentație, de unde s-au recoltat probe la 8, 12, 16, 24 și 48 de ore.

Compoziția mediului de fermentație folosit la aceste experiențe este redată în tabela 1.

Tabela 1

Mediul de fermentație folosit la creșterea celulelor de *Corynebacterium melassecola*

Componente	g la 100 ml
Melasă	10
Hidrolizat de drojdie	2
Extract de porumb	0,5
NH_4Cl	2
$Ca(H_2PO_4)_2H_2O$	0,3
$CaCO_3$	1

Activitatea DH și SDH a fost determinată pentru probele de fermentație recoltate în intervalele de timp menționate. În figurile 2 și 3 sînt reprezentate grafic valorile pentru DH și SDH împreună cu cantitatea de lizină obținută în intervalul 24—72 ore. Din aceste figuri se observă că DH și SDH prezintă activitate maximă la 16 ore de fermentație, iar valorile obținute sînt în raport invers proporțional cu cantitatea de lizină. Acest lucru a fost observat și în experiențele anterioare (5), cînd s-a lucrat pe un mediu care conținea extract de porumb. Rezultatele obținute de noi sînt concludente în cazul unui hidrolizat de drojdie furajeră de bună calitate, lucru reflectat și în cantitatea crescută de lizină obținută la 72 ore de fermentație (42 g lizină la litru). Aceste date sînt în concordanță cu observațiile din literatură (3), (4) care se referă la celule de *Corynebacterium* crescute pe mediu sintetic cu o compoziție constantă și bine definită.

Activitatea β-AK este maximă la fermentațiile de 24 ore, această perioadă corespunzînd cu biosinteza activă a lizinei. Valorile obținute pentru AK sînt prezentate în tabela 2.

În prima experiență, șarja a fost infectată, iar AK a prezentat valori foarte mici, care au corespuns unei cantități mici de lizină obținută în final. La celelalte experiențe, nivelul AK este mai ridicat, fapt care se reflectă și în cantitatea mai mare de lizină obținută la 72 ore. Valorile

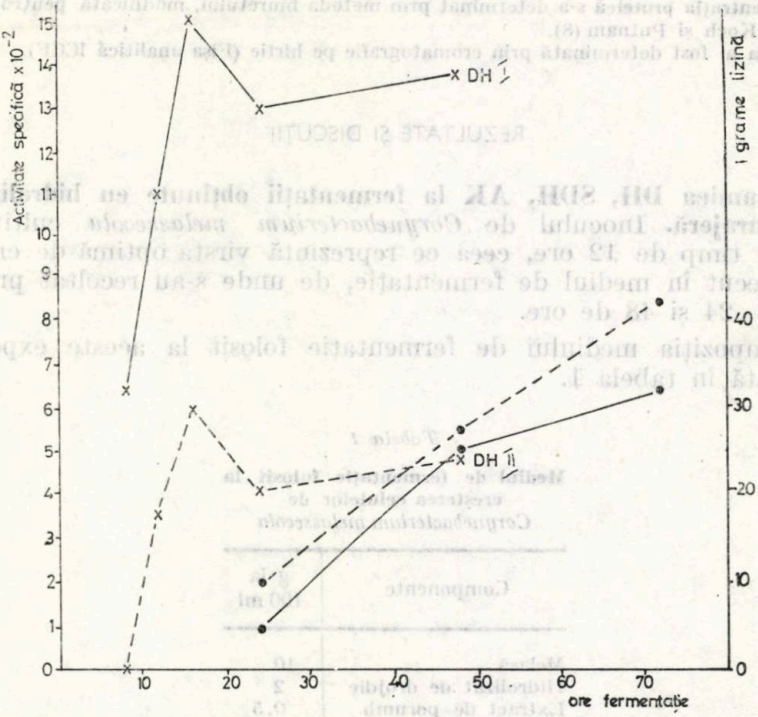


Fig. 2. — Nivelul DH la mediile cu hidrolizat de drojdie furajeră şi cantitatea de lizină obţinută.

×———× activitatea specifică pentru DH în experienţa I
●———● lizina corespunzătoare experienţei I
×– – –× activitatea specifică pentru DH în experienţa II
●– – –● lizina corespunzătoare experienţei II

$$\text{Activitatea specifică} = \frac{\mu\text{moli formazan/min}}{\Delta\ 330\ \text{nm}}$$

Tabela 2

Activitatea β-AK la fermentaţiile obţinute de la *Corynebacterium melassecola* ICCF-16 pe un mediu cu hidrolizat de drojdie furajeră

Enzima	Experienţa I							Experienţa II						Experienţa III					
ore fermentaţie	8	12	16	24	48	72		8	12	16	24	48	72	8	12	16	24	48	72
AK × 10^{-2} $\frac{\Delta\ 540\ n/min}{\Delta\ 330\ m}$	0,05	0,04	0,1	0,04	0,5	—		0	1,4	1,8	3,3	1,7	—	0,6	0,8	1,3	—	3	
Lizină (g/l)						20,3					5	25	32				10	27,5	42

înregistrate sugerează că hidrolizatul de drojdie poate fi socotit ca un înlocuitor eficient al extractului de porumb.

Dinamica DH, SDH, AK la fermentaţii obţinute cu hidrolizat de turtă proteică. Compoziţia mediului de fermentaţie folosit în aceste experienţe este redată în tabela 3.

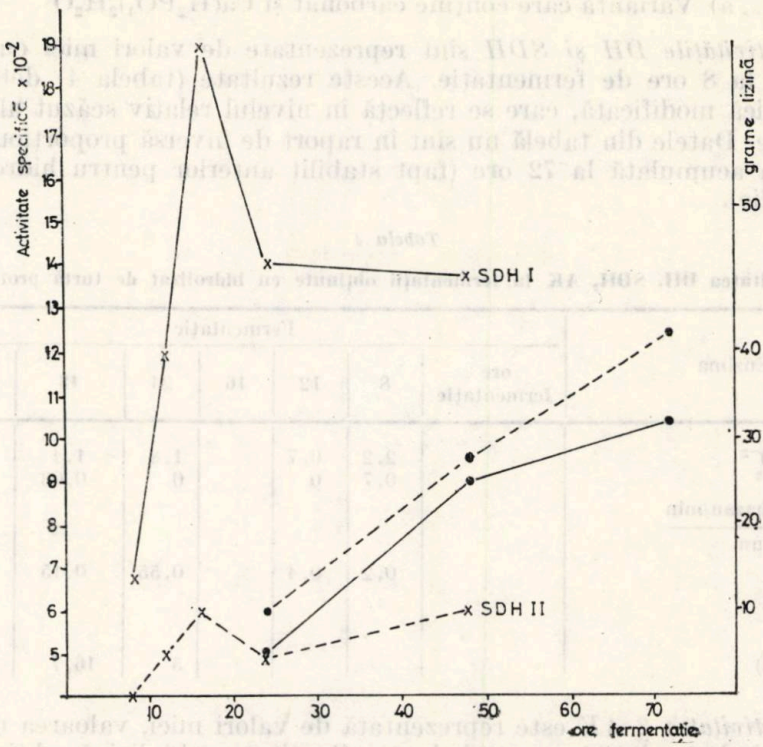


Fig. 3. — Nivelul SDH la mediile cu hidrolizat de drojdie furajeră și cantitatea de lizină obținută.

×——× activitatea specifică pentru SDH în experiența I
●——● lizina corespunzătoare experienței I
×– – –× activitatea specifică pentru SDH în experiența II
●– – –● lizina corespunzătoare experienței II

$$\text{Activitatea specifică} = \frac{\mu\text{moli formazan/min}}{\Delta\ 330\ \text{nm}}$$

Tabela 3

Mediul de fermentație

Componente	g la 100 ml
Melasă	10
Hidrolizat de turtă proteică	2
Extract de porumb	0,5
NH_4Cl	2
$Ca(H_2PO_4)_2H_2O$	0,3
$CaCO_3$	1

La determinările următoare, atît pentru hidrolizatul de turtă proteică, cît și pentru hidrolizatul de soia și hidrolizatul de porumb s-a mai folosit o variantă de mediu în care au fost îndepărtate $CaCO_3$ și superfosfatul de calciu.

a) Varianta care conţine carbonat şi $Ca(H_2PO_4)_2H_2O$

Activităţile DH şi SDH sînt reprezentate de valori mici cu nivele maxime la 8 ore de fermentaţie. Aceste rezultate (tabela 4) determină o dinamică modificată, care se reflectă în nivelul relativ scăzut al lizinei la 72 ore. Datele din tabelă nu sînt în raport de inversă proporţionalitate cu lizina acumulată la 72 ore (fapt stabilit anterior pentru hidrolizatul de drojdie).

Tabela 4

Activitatea DH, SDH, AK la fermentaţii obţinute cu hidrolizat de turtă proteică

Enzima	Fermentaţie						
	ore fermentaţie	8	12	16	24	48	72
SDH × 10^{-2}		2,2	0,7		1,8	1,4	—
DH × 10^{-2}		0,7	0		0	0,03	
µmoli formazan/min / 330 nm							
AK		0,2	0,4		0,55	0,15	
Δ 540/min / Δ 330							
Lizină (g/l)					5	16,7	20,4

Activitatea β-AK este reprezentată de valori mici, valoarea maximă înregistrîndu-se la 24 ore (tabela 4). Cantitatea de lizină obţinută la 72 ore este relativ mică, ceea ce ne sugerează faptul că acest înlocuitor nu este eficient pentru biosinteza de lizină.

b) Varianta de mediu fără carbonat şi $Ca(H_2PO_4)_2H_2O$

Activitatea DH şi SDH. Maximele obţinute se situează la 24 ore; restul valorilor sînt mici, ceea ce determină o dinamică modificată (tabela 5). Cantitatea de lizină obţinută la 72 ore este de numai 14 g, fapt ce ne sugerează că microorganismul în aceste condiţii de mediu s-ar fi putut să-şi aleagă o altă cale de biosinteză a lizinei.

Tabela 5

Activitatea DH, SDH la fermentaţii cu hidrolizat de turtă fără $CaCO_3$ şi superfosfat de Ca

Enzima	Experienţa I							Experienţa II					
	ore fermentaţie	8	12	16	24	48	72	8	12	16	24	48	72
DH × 10^{-2}		0	0	0,04	0,2	0,44	—	0	0	0,8	3	2	—
SDH × 10^{-2}		0	0	0,036	0,1	0,044	—	0	0	1,2	10,2	2	—
Lizină (g/l)					1,9	8,8	14				4,4	10	14

Activitatea β-AK. Valorile pentru AK sînt reprezentate în figura 4 şi se referă atît la varianta cu $CaCO_3$ şi superfosfat de calciu, cît şi la varianta fără $CaCO_3$ şi superfosfat. În aceste grafice am reprezentat şi

cantitatea de lizină obținută în intervalul 24—72 ore. Nivelele enzimatice pentru AK se află în raport invers proporțional cu cantitatea de lizină obținută la 72 ore. Acest lucru ne întărește concluzia stabilită anterior,

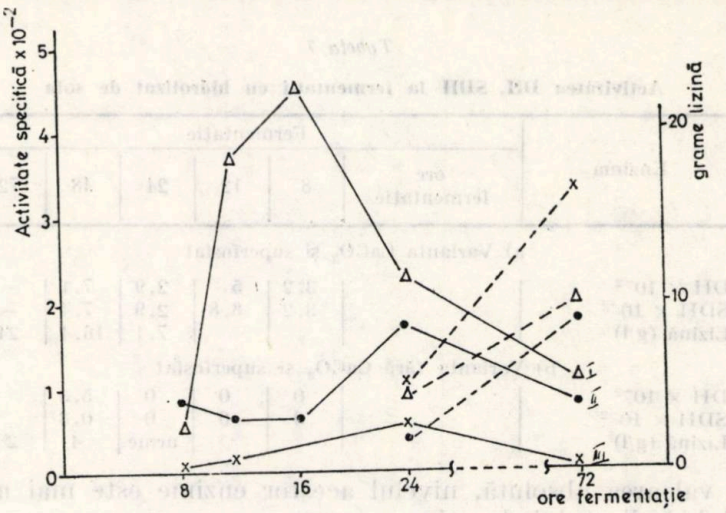


Fig. 4. — Nivelul AK la medii cu hidrolizat de turtă proteică.
△——△ turtă fără $CaCO_3$ și superfosfat (experiența I)
●——● turtă fără $CaCO_3$ și superfosfat (experiența II)
×——× turtă cu $CaCO_3$ și superfosfat (experiența III)
×– – –× lizina corespunzătoare experienței III
●– – –● lizina corespunzătoare experienței II
△– – –△ lizina corespunzătoare experienței I

$$\text{Activitatea specifică} = \frac{\Delta\ 540/\text{min}}{\Delta\ 330}$$

și anume că microorganismul utilizează în aceste condiții de mediu o altă cale metabolică în care producția de lizină este mult scăzută datorită modificărilor ce pot interveni în procesul de reglare a biosintezei acestui aminoacid.

Dinamica DH, SDH, AK la fermentații care conțin hidrolizat de soia. În tabela 6 este redată compoziția mediului de fermentație.

Tabela 6

Mediul de fermentație folosit la creșterea celulelor de *Corynebacterium melassecola*

Componente	g la 100 ml
Melasă	10
Hidrolizat de soia	2
Extract de porumb	0,5
$CaCO_3$	1
$Ca(H_2PO_4)_2H_2O$	0,27
NH_4Cl	2

a) Varianta cu carbonat de calciu şi $Ca(H_2PO_4)_2H_2O$

Activităţile DH şi SDH sînt reprezentate de două valori maxime la 12 şi 48 ore. Rezultatele sînt prezentate în tabela 7, varianta a.

Tabela 7

Activitatea DH, SDH la fermentaţii cu hidrolizat de soia

Enzima	Fermentaţie					
	ore fermentaţie	8	12	24	48	72
a) Varianta $CaCO_3$ şi superfosfat						
DH $\times 10^{-2}$		3,2	5	2,9	7,1	—
SDH $\times 10^{-2}$		3,2	6,8	2,9	7,4	—
Lizină (g/l)				7,1	16,4	24
b) Varianta fără $CaCO_3$ şi superfosfat						
DH $\times 10^{-2}$		0	0	0	5,3	
SDH $\times 10^{-2}$		0	0	0	0,3	
Lizină (g/l)				urme	4	20

În valoarea absolută, nivelul acestor enzime este mai mare decît în cazul hidrolizatului de soia.

b) Varianta fără carbonat şi $Ca(H_2PO_4)_2H_2O$ (tabela 7, varianta b)

Activităţile DH şi SDH sînt situate în jurul valorilor de zero, cu o singură valoare pozitivă la 48 ore, ceea ce determină modificări importante ale dinamicii acestor enzime, modificări care se reflectă în nivelul mai scăzut al enzimei faţă de varianta a.

Activitatea β-AK este reprezentată în figura 5 pentru cele două variante.

Valorile obţinute pentru AK din cele două variante sînt în raport de inversă proporţionalitate cu cantitatea de lizină din intervalul de 24—72 ore. În varianta a, β-AK prezintă valori minime, după care urmează o redresare a enzimei la 48 ore de fermentaţie. Această creştere a activităţii enzimatice nu este suficientă pentru a se produce o acumulare a lizinei în limite superioare. Acest fapt împreună cu valorile mici obţinute în cazul variantei b ne sugerează de asemenea o influenţă a aminoacizilor din mediu cu hidrolizat de soia sau prezenţa în mediu a unor inhibitori ai AK, care determină un nivel mai scăzut de lizină.

În scopul selectării mediului celui mai bun pentru producerea de lizină, în figurile 6 şi 7 am reprezentat nivelele enzimatice ale AK pentru fermentaţii cu hidrolizat de turtă proteică, hidrolizat de soia şi hidrolizat de porumb comparativ cu lizina obţinută la 24, 48 şi 72 ore.

Din aceste rezultate reiese că mediul cel mai eficient este cel care foloseşte extract de porumb în totalitate. În cazul acestuia, dinamica enzimelor studiate nu prezintă modificări în sensul respectării raportului de directă proporţionalitate între nivelul AK şi lizină şi al menţinerii maximelor de activitate în intervalul corespunzător cu perioada activă de biosinteză. În funcţie de cantitatea de lizină obţinută, în final urmează mediul cu hidrolizat de soia şi mediul cu hidrolizat de turtă proteică.

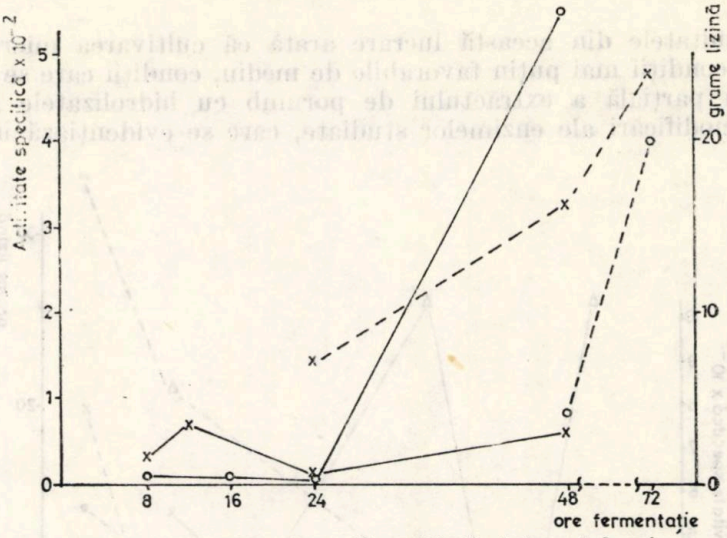


Fig. 5. — Nivelul AK la medii cu hidrolizat de șrot de soia.
×——× soia cu $CaCO_3$ și superfosfat Ca
o——o soia fără $CaCO_3$ și superfosfat
×– – –× } lizina corespunzătoare celor două variante
o– – –o }

$$\text{Activitatea specifică} = \frac{\Delta\, 540 \text{ nm/min}}{\Delta\, 330 \text{ nm}}$$

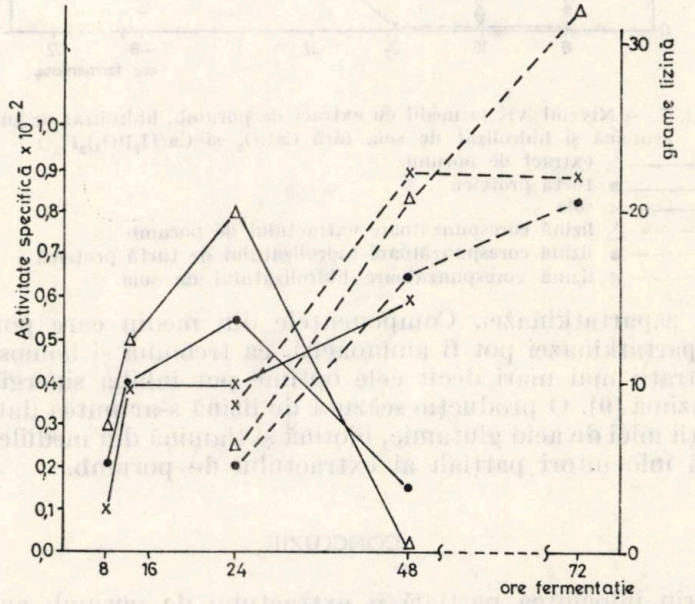


Fig. 6. — Nivelul AK la medii cu extract de porumb, hidrolizat de turtă proteică și hidrolizat de soia cu $CaCO_3$ și $Ca(H_2PO_4)_2H_2O$.
△——△ extract porumb
●——● turtă proteică
×——× soia
△– – –△
●– – –● } lizină corespunzătoare mediului
×– – –× }

Rezultatele din această lucrare arată că cultivarea microorganismului în condiţii mai puţin favorabile de mediu, condiţii care se referă la înlocuirea parţială a extractului de porumb cu hidrolizatele amintite, duce la modificări ale enzimelor studiate, care se evidenţiază în special

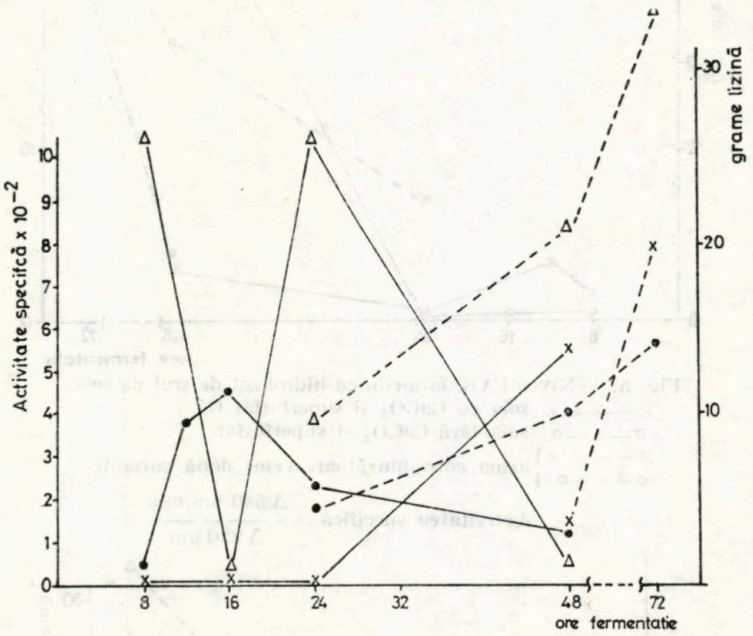


Fig. 7. — Nivelul AK la medii cu extract de porumb, hidrolizat de turtă proteică şi hidrolizat de soia fără $CaCO_3$ şi $Ca(H_2PO_4)_2H_2O$

△——△ extract de porumb
●——● turtă proteică
×——× soia
△- - -△ lizină corespunzătoare extractului de porumb
●- - -● lizină corespunzătoare hidrolizatului de turtă proteică
×- - -× lizină corespunzătoare hidrolizatului de soia

la nivelul aspartatkinazei. Componentele din mediu care pot influenţa nivelul aspartatkinazei pot fi aminoacizi, ca treonina şi homoserina, care în concentraţii mai mari decît cele optime pot inhiba sinergic cu lizina această enzimă (9). O producţie scăzută de lizină s-ar putea datora şi unei concentraţii mici de acid glutamic, biotină şi tiamină din mediile de cultură folosite ca înlocuitori parţiali ai extractului de porumb.

CONCLUZII

1. Prin înlocuirea parţială a extractului de porumb cu hidrolizat de turtă proteică şi şrot de soia se observă apariţia unor modificări la nivelul aspartatkinazei, succinatdehidrogenazei şi dehidrogenazelor totale.

2. Modificările dinamicii la nivelul aspartatkinazei se manifestă atît prin schimbări ale maximelor de activitate, cît şi prin modificarea raportului de directă proporţionalitate dintre aspartatkinază şi lizină.

Acest lucru sugerează influența fondului de aminoacizi din hidrolizatele de turtă proteică și șrot de soia asupra aspartatkinazei, ceea ce ar putea determina ca microorganismul să-și aleagă o altă cale metabolică pentru a sintetiza lizina. Această concluzie ne este sugerată și de producția mai mică de lizină obținută la 72 ore de fermentație.

3. În cazul extractului de porumb nu se observă modificări ale dinamicii enzimelor studiate.

4. Înlocuirea parțială a extractului de porumb indică mediul cu hidrolizat de drojdie furajeră ca cel mai bun înlocuitor, după care urmează hidrolizatul de soia și hidrolizatul de turtă proteică.

5. Adaosul de carbonat de calciu și superfosfat de calciu la mediul cu hidrolizat de soia indică un nivel mai ridicat de lizină decît cel obținut în varianta fără carbonat și fără fosfat.

Prezentat la redacție
la 30 mai 1983

* *Institutul de științe biologice, București*
și
** *Institutul de cercetări chimico-farmaceutice, București*

THE ACTIVITY OF SOME ENZYMES IN THE LYSINE PRODUCING *CORYNEBACTERIUM MELASSECOLA* CULTIVATED IN SEVERAL MEDIUM CONDITIONS

SUMMARY

Corynebacterium melassecola cells were grown in less favorable medium conditions when part of corn syrup was replaced with yeast extract, sunflower proteins cakes and soya bean extract. The effects of corn syrup replacement were noticed at the level of total dehydrogenases, succinic dehydrogenases and aspartate kinase, the dynamics of these enzymes being changed in comparison with the control medium containing corn syrup.

The changes of these enzymes activities were also apparent in the final production of lysine, the quantity of lysine being higher in the case of corn syrup and decreasing gradually for yeast extract, followed by soya bean extract and sunflower proteins cakes.

BIBLIOGRAFIE

1. Y. HIROSE, H. OKADA, *Microbial Technology*, vol. 1, sub red. H. PEPPLER, D. PERLMAN, Academic Press, New York, 1979.
2. ALAN WISEMAN (sub red.), *Principles of Biotechnology*, Surrey University Press, 1983, p. 217.
3. K. KIMURA, J. Gen. appl. Microbiol., **10**, 23 (1964).
4. P. GRIVIN, Priklod. Biochim. Microbiol., **41**, 22 (1962).
5. M. LUNGU și colab., St. cerc. biochim., **24**, 1 (1981).
6. E. KUN, I. G. ABOOD, Science, **109**, 144 (1949).
7. S. BLACK, N. H. WIGHT, J. biol. Chem., **213**, 27 (1955).
8. A. L. KOCH, S. L. PUTNAM, Anal. Biochem., **44**, 239 (1971).
9. A. O. MILSTEIN, L. YA. VULF, *Vredenie biochimiia mikroorganizmov*, Riga, 1972, p. 71.

METODĂ RAPIDĂ PENTRU DETERMINAREA SELECTIVĂ A α-AMILAZEI UTILIZÎND SUBSTRATE RETICULATE CONDIȚIONATE SUB FORMĂ DE TABLETE

(notă preliminară)

M. A. MATEESCU, H. D. SCHELL, ELENA ENACHE, T. BENȚIA, TEODORA VÂLSĂNESCU, V. ZARCHIEVICI *, CARMEN ROTARU *

Rezumat. Metoda descrisă se bazează pe utilizarea de substrate insolubile (amiloză reticulată, amidon reticulat) condiționate sub formă de tablete pentru determinarea rapidă, selectivă a α-amilazei. Tabletele sînt astfel realizate, încît să permită dezagregarea rapidă în mediu ; atacul hidrolitic al enzimei asupra substratului insolubil este urmat de eliberarea în mediu a unor fragmente oligozaharidice solubile. Cantitățile de oligozaharide astfel eliberate sînt în dependență lineară de activitățile α-amilazice și pot fi determinate prin măsurarea absorbanțelor compușilor de incluziune formați în urma reacției cu reactivul I_2/KI. Limitele de detecție ale metodei sînt comparabile cu cele ale metodei cromogenice, bazată pe utilizarea de substrate insolubile tabletate de tip „Phadebas".

α-Amilaza (EC 3.2.1.1) este o enzimă din clasa hidrolazelor cu largi implicații biomedicale și tehnologice de interes deosebit, în special pentru industria alimentară și chimico-farmaceutică.

Interesul acordat elaborării de noi metode rapide pentru determinarea selectivă a α-amilazei este pe deplin justificat, avînd în vedere atît ponderea testelor de amilazemie și amilazurie în diagnosticul unor maladii (pancreatite, parotidite, insuficiență renală etc.), cît și necesitatea stabilirii unor metode convenabile pentru controlul proceselor de obținere a α-amilazei din diferite surse biologice.

În acest scop au fost elaborate o serie de metode de determinare selectivă a α-amilazei folosind substrate insolubile obținute prin reticularea amilozei (1), (2), (3), (4) sau amidonului. Aceste substrate macromoleculare pot fi transformate în substrate cromogene prin grefare de coloranți (5), (6) și permit determinarea colorimetrică a α-amilazei.

Unele substrate cromogene au fost condiționate sub formă de tablete și sînt larg utilizate (produse de tip „Phadebas") (7), (8).

În laboratorul nostru s-a stabilit recent o metodă nouă, amiloclastică (9), pentru determinarea selectivă a α-amilazei, folosind ca substrat insolubil amiloza reticulată, care prin acțiunea endoamilazică a enzimei eliberează din interiorul rețelei fragmente oligozaharidice solubile, capabile să formeze în mediu compuși de incluziune cu iodul.

Concentrația acestor compuși de culoare albastră poate fi determinată colorimetric, viteza de creștere a absorbanțelor fiind în dependență lineară de activitatea enzimei.

În lucrarea de față prezentăm o modificare a metodei de determinare selectivă a α-amilazei menționată mai sus, prin utilizarea substratului insolubil condiționat sub formă de tablete. Tabletarea substratelor prezintă o serie de avantaje, între care eliminarea unor operații pe parcursul determinării, micșorarea timpului necesar unei analize, reproductibilitate avansată și, prin acestea, posibilitatea introducerii procedeului ca metodă de serie.

Practic, pentru obținerea tabletelor au fost utilizate atît amiloză-X-10, cît și amidon-X-2,5 [1]. Reticularea a fost realizată prin tratarea polizaharidelor cu epiclorhidrină în condiții descrise anterior (10), (11).

Condiționarea sub formă de tablete a fost efectuată astfel : amiloza reticulată, amestecată cu lactoză și manitol, a fost granulată cu o soluție de gelatină 5%, uscată la 60°C, ulterior amestecată cu celelalte substanțe (Avicel PH 101, talc, stearat de magneziu), după care amestecul s-a omogenizat într-o tobă înclinată la 45°C și s-a trecut prin sita 45 (latura ochiului 0,37 mm). Comprimarea a fost efectuată pe ponson de 9 mm. S-au obținut tablete albe, în greutate de 0,20 g, care conțin 0,06 g amiloză reticulată pe tabletă. În cazul utilizării amidonului X-2,5 ca substrat, condiționarea a fost efectuată în același mod, cu mențiunea că un comprimat de 0,20 g conține 0,075 g substrat.

Determinările de activități enzimatice, în condițiile folosirii tabletelor, decurg astfel :

Martor	Probă
2 ml H_2O	2 ml H_2O
1 ml probă (α-amilază)	1 ml probă (α-amilază)
1 ml soluție HCl 1 N (stopare)	1 ml —
1 tabletă (substrat)	1 tabletă (substrat)
Incubare 3 min	
—	1 ml soluție HCl 1 N (stopare)
6 ml soluție I_2 2.10^{-3} N	6 ml soluție I_2 2.10^{-3} N
Absorbanța la 570 nm	Absorbanța la 570 nm
ΔA/min	

Reacția se efectuează direct în eprubete de centrifugă [2].

Activitățile α-amilazice determinate conform metodei utilizînd tabletele pe bază de amiloză reticulată se calculează cu ajutorul relațiilor :

(1) Activitatea enzimatică $= 4{,}86 . \Delta A/min/ml$ [mg amidon hidrolizat/min/ml]

Activitate specifică $= 4{,}86 . \Delta A/min/mg$ proteină [mg amidon hidrolizat/min/mg proteină]

Constanta 4,86 reprezintă factorul de transformare al unităților de absorbanță în unități enzimatice determinate pe același preparat enzimatic prin metoda iodometrică Wohlgemuth (12).

---

[1] X arată că substratele sînt reticulate, iar cifra indică cantitatea de epiclorhidrină introdusă în reacție pentru a reticula 100 g polizaharide.

[2] Deși produsele realizate prezintă o viteză mare de depunere, totuși este preferabilă centrifugarea probelor la 3000 rotații/min, timp de 10 min, reținînd supernatantul pentru colorimetrare.

Procedeul de tabletare şi ingredientele adăugate au fost astfel alese, încît să nu afecteze proprietăţile de substrat ale polizaharidelor utilizate. În cazul utilizării amilozei-X-10 sub formă de pulbere, constanta din relaţia (1) are valoarea 4,46, sensibil apropiată de valoarea 4,86, stabilită

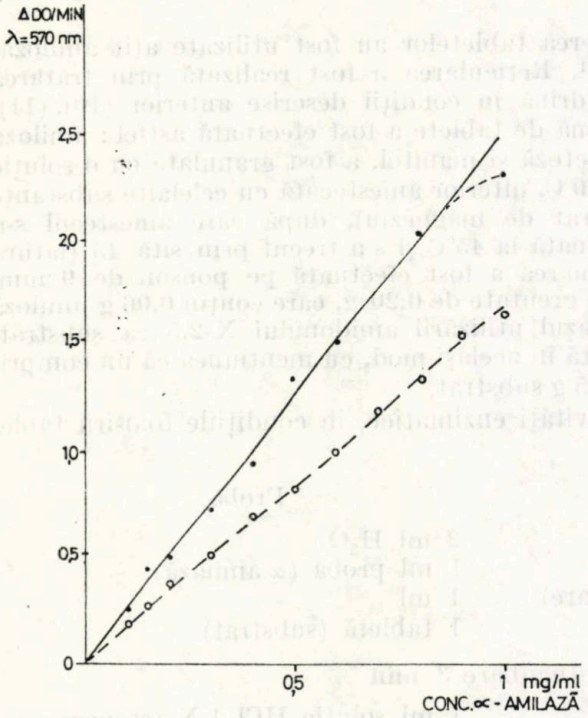


Fig. 1. — Influenţa diferitelor concentraţii de α-amilază asupra vitezelor de reacţie determinate utilizînd tablete ce conţin amiloză-X-10 (● —— ●) şi amidon-X-2,5 (o — — o).

în cazul utilizării substratului tabletat. În acelaşi timp, condiţionarea sub formă de tablete nu a afectat nici dependenţa lineară a vitezei de creştere a absorbanţelor de concentraţiile (activităţile) α-amilazei introduse în reacţie (fig. 1).

În cazul utilizării amidonului reticulat, studiile efectuate privind dependenţa dintre gradul de reticulare şi proprietăţile de substrat au indicat ca optim produsul de tip amidon-X-2,5. În acest caz, utilizînd tablete pe bază de amidon reticulat, activităţile enzimatice se calculează conform relaţiei :

(2) Activitatea enzimatică $= 7{,}35 . \Delta A/\text{min}/\text{ml}$

Diferenţele constatate între cele două tipuri de produse sînt datorate faptului că viteza de hidroliză enzimatică a amilozei-X-10 este superioară celei de hidroliză a amidonului-X-2,5, probabil din cauza conţinutului relativ ridicat în amilopectină a acestuia, fapt care generează şi eliberarea de oligozaharide care nu formează compuşi de incluziune cu iod. Menţionăm că diferenţa dintre vitezele de hidroliză ale celor două produse este de circa 30%, motiv pentru care este deschisă şi perspectiva utilizării amidonului reticulat ca substrat pentru determinarea α-amilazei prin metoda amiloclastică propusă.

Date preliminare obținute prin aplicarea metodei propuse au indicat pentru α-amilaza serică de la subiecți normali 295 ± 21 UE/l, iar prin aplicarea metodei cromogenice cu substrat „Phadebas", în cazul acelorași probe, valorile stabilite au fost de 295 ± 27 UE/l, ceea ce denotă deplina concordanță dintre cele două metode, cu mențiunea că timpul afectat unei determinări este mult mai scurt în cazul metodei noastre.

Aspecte privind utilizarea în laboratoare clinice a metodei propuse ca probă-test pentru diagnostic vor fi prezentate în note viitoare.

Mulțumiri. Lucrarea a fost efectuată în cadrul unei teme-contract cu Academia de științe medicale. Autorii își exprimă cu această ocazie alese mulțumiri conducerii Academiei de științe medicale și dr. docent Marcela Zamfirescu-Gheorghiu pentru întreg sprijinul acordat cu generozitate pe parcursul elaborării acestei lucrări.

Prezentat la redacție
la 25 aprilie 1983

Institutul de științe biologice
București, Splaiul Independenței nr. 296
și
* *Institutul pentru controlul de stat al medicamentului și cercetări farmaceutice, București*

AMYLOCLASTIC METHOD FOR THE SELECTIVE DETERMINATION OF α-AMYLASE USING INSOLUBLE CL-AMYLOSE AND CL-STARCH TABLETS (preliminary note)

SUMMARY

The described method is based on the use of CL-amylose and CL-starch tablets as specific substrates for the selective determination of α-amylase. The procedure to perform the tablets is such to allow a quick disintegration of tablets in the reaction medium. The hydrolytic attack of the enzyme on the insoluble substrates is followed by the release of amounts of soluble oligosaccharide fragments in a linear dependence on the enzyme activity. The amount of these oligosaccharide fragments can be estimated from the absorbancies of their inclusion blue complexes with iodine. The detection limit of the proposed method is lower and the sensitivity is in the same range with those of the chromogenic (Phadebas) method.

BIBLIOGRAFIE

1. M. A. MATEESCU, H. D. SCHELL, F. MIHĂILESCU, I. CORNOIU, Biochimie, **58**, 875 (1976).
2. M. A. MATEESCU, Biochimie, **60**, 535 (1978).
3. M. A. MATEESCU, I. CORNOIU, H. D. SCHELL, Anal. Lett., **13**, 1567 (1980).
4. M. A. MATEESCU, H. D. SCHELL, T. BENȚIA, Carbohyd. Res., **116**,... (1983).
5. L. M. EWEN, Clin. Chim. Acta, **16**, 32 (1970).
6. M. CESKA, E. HULTMAN, B. G. A. IGELMAN, Experientia, **85**, 355 (1969).
7. M. D. O'DONNELL, K. F. McGEENEY, Enzyme, **18**, 348 (1974).
8. K. F. McGEENEY, *Isoamylase — S-type amylase and P-type amylase*, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, 1980.
9. M. A. MATEESCU, St. cerc. biochim., **24**, 175 (1981).
10. M. ȘERBAN, M. A. MATEESCU, H. D. SCHELL, Brevet R. S. România 61524/1976.
11. M. ȘERBAN, H. D. SCHELL, M. A. MATEESCU, Rev. roum. Biochim., **12**, 187 (1975).
12. J. WOHLGEMUTH, Biochem. Z., **9**, 1 (1908).

STUDII ASUPRA COMPUȘILOR STEROIDICI DIN PLANTA ȘI CULTURILE DE ȚESUTURI DE *SOLANUM LACINIATUM* AIT.

ERSILIA MUNTEANU, VICTORIA CIURDARU, CORNEL BODEA

Rezumat. Culturile de țesuturi de frunză, lăstari și rădăcină de *Solanum laciniatum* Ait. crescute pe mediul mineral Murashige-Skoog agarizat, îmbogățit cu un amestec de substanțe de creștere (vitamine, aminoacizi, chinetină și acid α-naftilacetic sau acid 2,4-diclorfenoxiacetic), s-au dovedit capabile de a sintetiza compuși steroidici. Analiza cromatografică pe strat subțire evidențiază 7—9 pete principale, între care certă este prezența sterolilor, a solasodinei și a unui compus cu Rf identic cu al lanosterolului ; ceilalți compuși steroidici, detectați pe cromatograme prin reacții specifice de culoare, sînt probabil sapogenine. Pentru țesuturile de calus de proveniență diferită, vîrstă diferită, crescute pe două variante de mediu diferind prin natura auxinei, spectrul de compuși steroidici detectați este același și totodată același cu spectrul din organele plantei cultivate în cîmp. Pe de altă parte, potențialul biosintetic al compușilor steroidici din țesuturile de calus de *Solanum laciniatum* Ait. este inferior celui al plantei.

Datorită conținutului în compuși cu structură steroidică importanți ca substanțe de plecare în sinteze parțiale de hormoni steroizi, *Solanum laciniatum* Ait. a fost introdusă în cultura in vitro în speranța găsirii condițiilor adecvate obținerii economice a acestor compuși.

Cercetările noastre au urmărit comparativ capacitatea plantei și a țesuturilor de calus de frunză, lăstari și rădăcină de *Solanum laciniatum* Ait. de a sintetiza steroli, sapogenine și solasodină.

Pînă în prezent a fost semnalată în mai multe cazuri biosinteza sterolilor și sapogeninelor în culturile de calus de *Solanum laciniatum* Ait. (1), (2), (3) și într-un singur caz biosinteza alcaloidului steroidic, solasodina (4).

În această lucrare se prezintă rezultatele analizei cromatografice pe strat subțire a tipurilor de compuși steroidici menționați, prezenți în plantă și în culturile de țesuturi de frunză, lăstari și rădăcină de *Solanum laciniatum* Ait.

MATERIAL ȘI METODĂ

În vederea studierii compușilor steroidici, țesuturile de calus de frunză, lăstari și rădăcină de *Solanum laciniatum* Ait. crescute pe două variante de mediu de cultură diferind doar prin natura auxinei au fost reunite în opt probe de analiză, care au fost investigate comparativ cu probe din organele plantei cultivate în cîmp (frunze, lăstari, rădăcină), deci în total 11 probe (tabela 1).

Ca mediu de cultură s-a folosit mediul mineral Murashige-Skoog (5) solidificat cu agar, conținînd ca sursă de hidrați de carbon zaharoza (3%). Mediul de bază a fost suplimentat

cu vitamine (tiamină 0,100 mg/l, piridoxină 0,500 mg/l, acid nicotinic 0,500 mg/l, mioinozitol 100 mg/l), aminoacizi (glicină 2 mg/l, hidrolizat de cazeină 1000 mg/l), un derivat al acizilor nucleici (chinetina 1 mg/l) și o auxină (acid α-naftilacetic 4 mg/l în varianta 1 de mediu, respectiv acid 2,4-diclorfenoxiacetic 1 mg/l în varianta 2). Recipientele de cultură au fost menținute într-un termostat iluminat cu tuburi luminescente, care au asigurat 700—1500 lucși, la o temperatură de 25 ± 2°C și o umiditate relativă a aerului de circa 70 %.

Tabela 1

Probe supuse analizei de compuși steroidici

Proba	Proveniența	Vîrsta calusului (săptămîni)	Varianta de mediu
1	calus de frunză	pînă la 58	1
2	calus de frunză	58—102	1
3	calus de frunză	pînă la 58	2
4	calus de frunză	58—102	2
5	calus de lăstari	pînă la 58	1
6	calus de lăstari	pînă la 58	2
7	calus de rădăcină	pînă la 52	1
8	calus de rădăcină	pînă la 42	2
9	frunze	—	—
10	lăstari	—	—
11	rădăcină	—	—

Probele de analizat, uscate la 50°C și fin mărunțite, au fost investigate din punctul de vedere al prezenței sterolilor și sapogeninelor după metoda utilizată de Jain și colab. (6). Cîte 10 g material s-au extras în Soxhlet 24 de ore cu eter de petrol și apoi 8 ore cu benzen. Materialul degresat a fost repulverizat și supus hidrolizei acide cu HCl apos 10 %, apoi s-a transferat pe pîlnie Büchner și s-a spălat pînă la pH aproximativ 5 al apelor de spălare. Pentru extracția sterolilor și sapogeninelor, materialul rămas în pîlnia Büchner a fost uscat, repulverizat și apoi extras 48 de ore cu cloroform (pentru extracție completă, timpul dat în literatura menționată s-a dovedit a fi insuficient). Extractele cloroformice au fost concentrate la evaporatorul rotativ.

Analiza solasodinei a fost condusă după metoda folosită de Hosoda și Yatazawa (3). Materialul de analiză s-a extras la rece cu acetonă, după care extrasul s-a acidificat cu acid acetic 10 % la pH aproximativ 3,2, s-a concentrat și s-a extras cu clorură de metilen, fracțiunea conținînd sterolii (fracțiunea A). În vederea separării glicoalcaloizilor (fracțiunea B), soluția apoasă, rămasă după extracția sterolilor, s-a alcalinizat cu NH_4OH conc. la pH aproximativ 10 și s-a extras cu clorură de metilen. Extractul în clorură de metilen uscat pe Na_2SO_4 anhidru s-a concentrat, iar reziduul s-a dizolvat în alcool etilic și a fost supus hidrolizei acide cu HCl conc. pe baie de apă. Pentru eliberarea solasodinei, hidrolizatul a fost tratat cu NH_4OH conc. pînă la pH aproximativ 10 și apoi s-a refluxat pe baie de apă. Extracția agliconului steroidic s-a făcut apoi cu clorură de metilen.

În vederea evitării pierderilor de glicoalcaloizi, respectiv de solasodină, soluția apoasă cu pH aproximativ 10, rămasă după extracția cu clorură de metilen a fracțiunii B conform metodei lui Hosoda și Yatazawa (3), a fost evaporată la sec. Reziduul s-a tratat cu alcool etilic, lăsîndu-se peste noapte. Soluția alcoolică filtrată a fost concentrată la volum mic, reprezentînd fracțiunea C. Pentru evidențierea solasodinei, această fracțiune a fost prelucrată în continuare întocmai ca fracțiunea B.

Compușii steroidici au fost analizați prin tehnica cromatografiei pe strat subțire de silicagel G (Merck) de 0,5 mm grosime, pentru comparație utilizîndu-se probe autentice de steroli (β-sitosterol, stigmasterol, campesterol, colesterol), diosgenină, solasodină și lanosterol. În vederea separării compușilor mai puțin polari s-au folosit sistemele de solvenți: A) cloroform — acetat de etil (95 : 5), B) clorură de metilen—alcool metilic (97 : 3), C) clorură de metilen—acetat de etil (97 : 3) și D) eter de petrol—benzen — acetat de etil (85 : 5 : 10), iar pentru separarea compușilor mai polari sistemele : E) eter etilic — alcool metilic — benzen (9 : 1 : 10), F) cloroform — alcool metilic (19 : 1) și G) benzen — acetonă (2 : 1). Vizualizarea petelor corespunzătoare sterolilor și sapogeninelor s-a făcut prin stropirea cromatogramelor cu reactivi specifici de culoare : acid clorosulfonic, reactiv Liebermann—Burchard, acid fosfomolibdenic (toți reactivii au indicat același spectru de compuși), iar pentru solasodină s-a folosit și reactiv Dragendorff.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Analiza cromatografică pe strat subţire a extractelor cloroformice conţinînd sterolii şi sapogeninele a evidenţiat următoarele aspecte mai importante :

Toate cele opt probe de calus şi cele trei probe provenite din organe ale plantei au arătat la developare cu cele şapte sisteme de solvenţi acelaşi spectru de compuşi în domeniul compuşilor mai puţin polari şi de asemenea al compuşilor mai polari, după cum rezultă din cromatogramele 1 şi 2.

În gama compuşilor mai polari, prin developare cu sistemele de solvenţi A, B, C şi D, toate cele patru sisteme de solvenţi separă un compus cu acelaşi Rf ca al lanosterolului de referinţă şi de asemenea un compus cu acelaşi Rf ca al sterolilor de referinţă (un sterol sau amestec de steroli, întrucît amestecul sterolilor de referinţă a dat pată unitară la developare cu toate sistemele de solvenţi folosite) (tabela 2). Astfel,

Tabela 2

Valori Rf medii ale unor compuşi steroidici (steroli, sapogenine) mai puţin polari separaţi din plantă şi ţesuturile de calus de *Solanum laciniatum* Ait. prin cromatografie pe strat subţire de silicagel G comparativ cu unele probe autentice

Sistem de solvenţi	Valori Rf medii ale principalilor compuşi steroidici din plantă şi calus	Valori Rf ale probelor autentice		
		diosgenină	steroli	lanosterol
A. cloroform-acetat de etil (95 : 5)	0,27 0,38 0,50 0,65 0,73	0,38	0,50	0,65
B. clorură de metilen-alcool metilic (97 : 3)	0,36 0,52 0,61 0,75	0,52	0,61	0,75
C. clorură de metilen-acetat de etil (97 : 3)	0,13 0,17 0,25 0,31 0,50	0,17	0,31	0,50
D. eter de petrol-benzen-acetat de etil (85 : 5 : 10)	0,12 0,28 0,49 0,85	0,17	0,28	0,49

studiile noastre, ca şi cercetările lui Vágújfalvi şi colab. (1), Supniewska şi Dohnal (2), Hosoda şi Yatazawa (3), relevă biosintetizarea de steroli în ţesuturile de calus de *Solanum laciniatum* Ait. şi evidenţiază de asemenea formarea unui compus cu acelaşi Rf ca al lanosterolului, menţionat

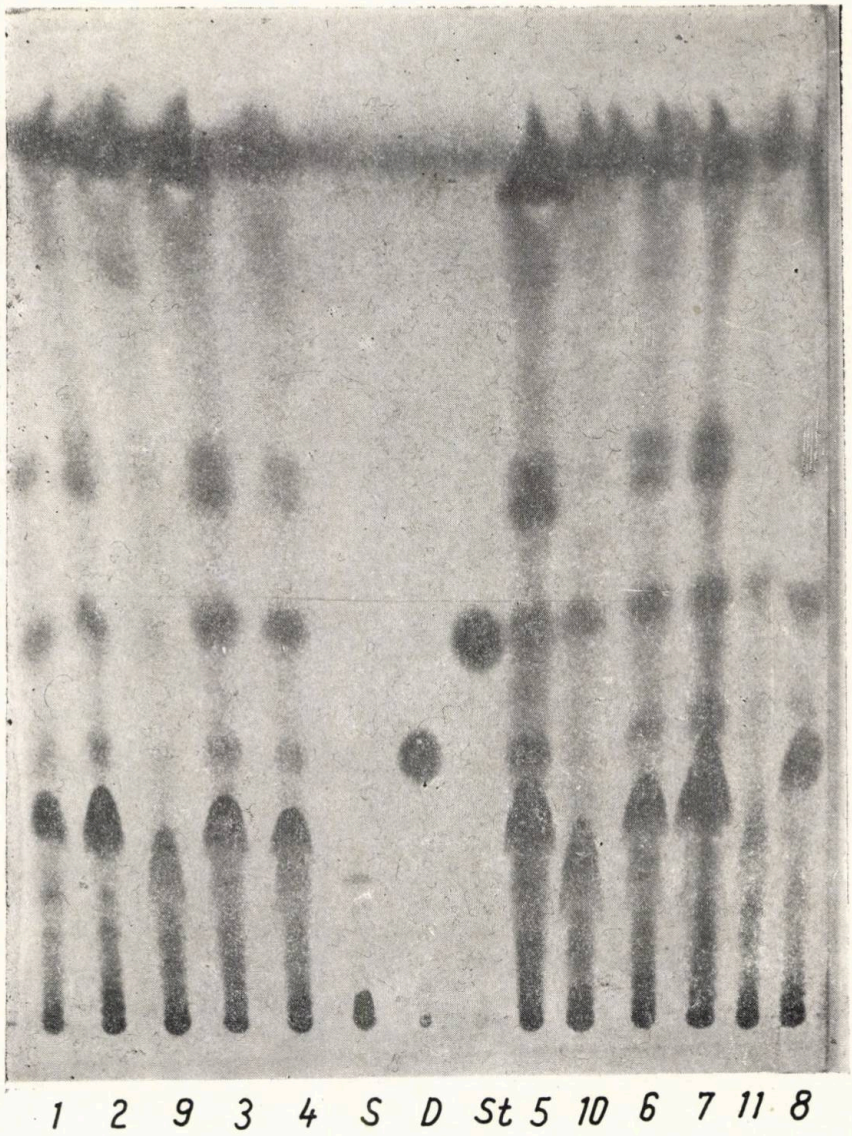


Fig. 1. — Evidențierea sterolilor și a sapogeninelor din *Solanum laciniatum* Ait. prin cromatografie pe strat subțire folosind sistemul de solvenți cloroform—acetat de etil (95 : 5) : 1, 2, 3, 4 = calus frunză ; 5, 6 = calus lăstari ; 7, 8 = calus rădăcină ; 9 = frunză ; 10 = lăstari ; 11 — rădăcină ; St = steroli ; D = diosgenină ; S = solasodină.

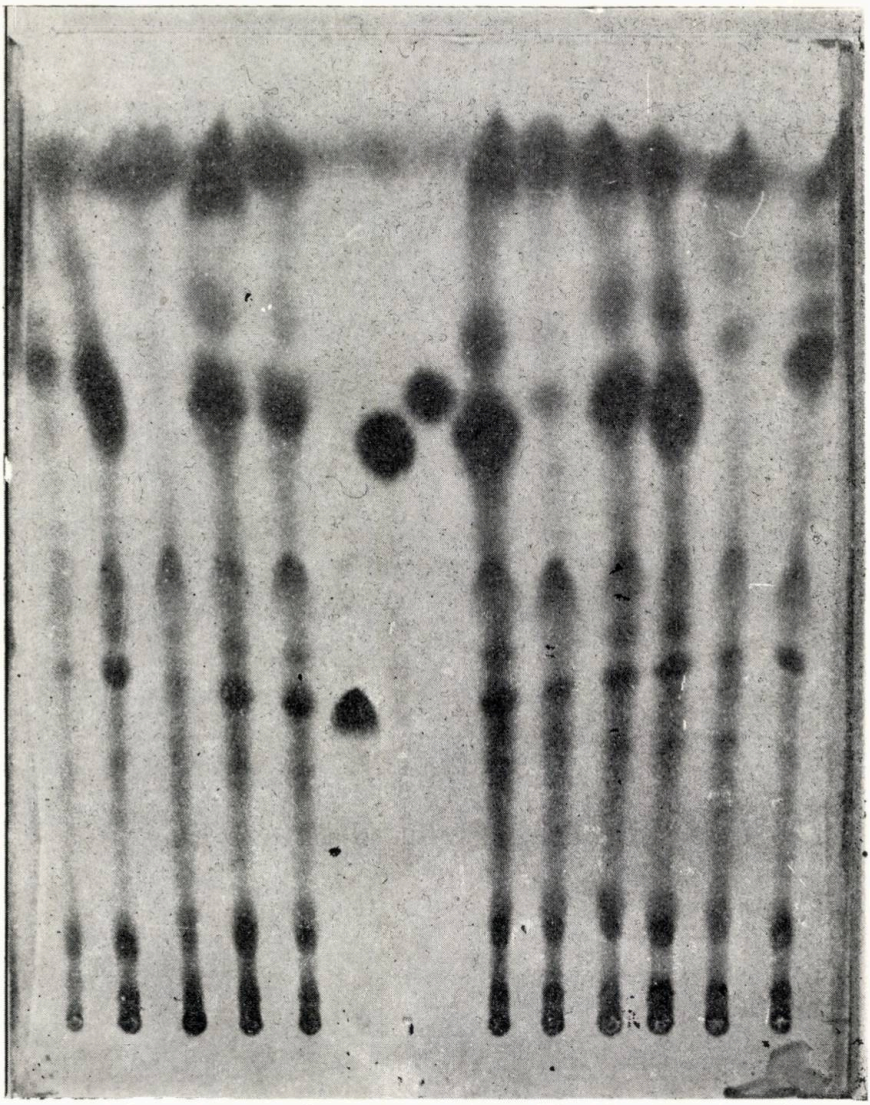


Fig. 2. — Evidenţierea sterolilor şi a sapogeninelor din *Solanum laciniatum* Ait. prin cromatografie pe strat subţire folosind sistemul de solvenţi eter etilic — alcool metilic — benzen (9 : 1 : 10) : 1, 2, 3, 4 = calus frunză ; 5, 6 = calus lăstari ; 7, 8 = calus rădăcină ; 9 = frunză ; 10 = lăstari ; 11 = rădăcină ; St = steroli ; D = diosgenină ; S = solasodină.

ca prezent în culturile de țesuturi ale acestei plante de către Hosoda și Yatazawa (3).

În ceea ce privește diosgenina, aparținînd gamei de compuși mai puțin polari, dintre cele patru sisteme de solvenți folosite la developare, doar trei (A, B și C) separă un compus cu același Rf ca al diosgeninei autentice. La cromatografierea alături și la cocromatografierea cu diosgenină și developare cu sistemul de solvenți D, diosgenina autentică se separă net de compușii prezenți în probe, fapt pentru care apreciem prezența diosgeninei ca incertă (tabela 2).

Tot în gama compușilor mai polari, se separă încă 2—3 pete ale unor compuși care se comportă ca steroizii la stropirea cu reactivii specifici de culoare, avînd valori Rf diferite de cele ale probelor autentice utilizate. Dintre acești compuși face parte componentul steroidic major al materialului analizat (după cum indică analiza cromatografică), reprezentat de o pată intensă în formă de căciulă (Rf = 0,27 în sistemul cloroform-acetat de etil 95 : 5), ultima separată din gama compușilor mai puțin polari (tabela 2).

În gama compușilor mai polari separați la developarea cu sistemele de solvenți E, F și G, de asemenea s-au evidențiat 2—3 pete ale unor compuși neidentificați din lipsa standardelor (tabela 3).

Tabela 3

Valori Rf medii ale unor compuși steroidici (steroli, sapogenine) mai polari separați din plantă și țesuturile de calus de *Solanum laciniatum* Ait. prin cromatografie pe strat subțire de silicagel G

Sistem de solvenți	Valori Rf medii ale principalilor compuși steroidici din plantă și calus
E. eter etilic-alcool metilic-benzen (9 :1 :10)	0,03 0,11 0,36
F. cloroform-alcool metilic (19 : 1)	0,07 0,21 0,44
G. benzen-acetonă (2 : 1)	0,06 0,20

Comportarea compușilor rămași neidentificați în condițiile tehnicii de analiză utilizate ar putea indica apartenența lor la grupa sapogeninelor.

Ca și studiile efectuate de Supniewska și Dohnal (2), cercetările noastre evidențiază, în condițiile de cultivare asigurate, abilitatea calusurilor de a sintetiza un spectru larg de compuși steroidici, dar, spre deosebire

de acestea, cercetările noastre par să indice un proces de biosinteză in vitro asemănător celui in vivo, cel puţin al compuşilor detectaţi prin această metodă.

Analiza cromatografică pe strat subţire a fracţiunilor hidrolizate B şi C, obţinute conform metodicii menţionate, a relevat prezenţa solasodinei, aparţinînd gamei compuşilor mai polari.

La cromatografierea pe strat subţire a reziduului extractelor în clorură de metilen reluate în cloroform alături de solasodină autentică şi la cocromatografierea cu aceasta şi developare cu sistemele de solvenţi E, F şi G, din probele de organe ale plantei (frunze, lăstari, rădăcini) s-a separat o pată cu acelaşi Rf ca al solasodinei (Rf = 0,36 în sistemul de solvenţi E, Rf = 0,14 în sistemul F şi Rf = 0,16 în sistemul G). Acest fapt a fost relevat la stropirea cromatogramelor cu toţi reactivii de culoare specifici menţionaţi, inclusiv cu reactivul Dragendorff, cînd din spectrul de compuşi separaţi doar solasodina a dat pată colorată caracteristic în roşu. Totodată, compararea intensităţii petelor corespunzătoare solasodinei arată o cantitate superioară în frunze, faţă de lăstarii şi rădăcina plantei.

În aceleaşi condiţii de lucru a fost detectată prezenţa solasodinei în probele de calus analizate, indiferent de provenienţă (frunze, lăstari, rădăcină), de natura auxinei din mediul de cultură (acid α-naftilacetic sau acid 2,4-diclorfenoxiacetic) şi de vîrsta culturii. Intensitatea petelor de solasodină detectate în calusurile analizate a indicat un proces de biosinteză mai puţin activ al acestui compus in vitro şi totodată mai puţin activ decît al celorlalţi compuşi steroidici prezenţi în aceste ţesuturi. Examinarea soluţiei apoase de pH aproximativ 10 rămasă după extracţia fracţiunii B, considerată de Hosoda şi colab. (4) lipsită de glicoalcaloizi, a relevat clar prezenţa glicoalcaloizilor şi, respectiv, a solasodinei.

Chiar dacă abilitatea ţesuturilor de calus de *Solanum laciniatum* Ait. de a sintetiza solasodină s-a dovedit inferioară abilităţii plantei de a produce acest compus, cercetările noastre, alături de cele ale lui Hosoda şi colab. (4), infirmă părerea potrivit căreia această sinteză nu este posibilă in vitro. Aceste cercetări dau speranţa găsirii condiţiilor adecvate obţinerii economice in vitro a solasodinei, alături de ceilalţi compuşi steroidici menţionaţi.

CONCLUZII

1. Culturile de ţesuturi de frunză, lăstari şi rădăcină de *Solanum laciniatum* Ait. sînt capabile de a sintetiza compuşi steroidici.

2. Există o similitudine în spectrul compuşilor steroidici din culturile de ţesuturi de provenienţă diferită (frunze, lăstari, rădăcină), vîrstă diferită (aspect cercetat la calusul de frunză), crescute pe două variante de mediu diferind prin natura auxinei (acid α-naftilactic sau acid 2,4-diclorfenoxiacetic) şi spectrul compuşilor steroidici din organele plantei cultivate în cîmp.

3. Analiza cromatografică pe strat subţire indică 7—9 pete principale corespunzătoare unor compuşi care se comportă ca steroizii, între care

certă este prezența sterolilor, a solasodinei și a unui compus cu același Rf ca al lanosterolului; ceilalți compuși detectați aparțin, probabil, sapogeninelor.

4. Capacitatea țesuturilor de calus de *Solanum laciniatum* Ait. de a sintetiza solasodină este evident inferioară capacității plantei de a sintetiza acest compus și totodată inferioară și celorlalți compuși steroidici detectați în calus.

Autorii mulțumesc dr. Barbara Dohnal de la Institutul de farmacologie Cracovia, prof. dr. S. J. Stohs de la Universitatea Nebraska, Colegiul de farmacie Omaha, prof. dr. D. N. Kirk de la Colecția de steroizi de referință, Colegiul Westfield, Londra, dr. K. L. Simpson de la Universitatea Rhode Island, dr. Noriyo Hosoda de la Universitatea Nagoya, Facultatea de agricultură, pentru probele de referință trimise.

Prezentat la redacție la 3 februarie 1983

Institutul agronomic „Dr. Petru Groza", Cluj-Napoca

STUDIES ON STEROID COMPOUNDS IN *SOLANUM LACINIATUM* AIT. AND THE TISSUE CULTURES OF THIS PLANT

SUMMARY

The tissue cultures of leaf, shoots and root of *Solanum laciniatum* Ait. grown on a Murashige-Skoog mineral medium solidified with agar, enriched with a mixture of stimulating substances (vitamins, aminoacids, kinetin and α-naphthaleneacetic acid or 2,4-dichlorophenoxyacetic acid) are able to synthesize steroid compounds. TLC-analysis reveals 7 to 9 main spots between these two clear spots for sterols and solasodine and also a spot with Rf-value corresponding to lanosterol; the other steroid compounds, detected by specific color-reaction on chromatograms, are probably sapogenins. Independent of the origin and of the age of calluses and also of the auxin in the medium, the spots-spectrum is the same, and also the same with the spectrum of the steroid compounds from soil-grown plants. On the other hand, the biosynthetic potential of steroid compounds in *Solanum laciniatum* Ait. tissue cultures is lower than those in the plant.

BIBLIOGRAFIE

1. D. VÁGÚJFALVI, M. MAROTI, P. TETÉNYI, Phytochemistry, **10**, 1389 (1971).
2. J. H. SUPNIEWSKA, B. DOHNAL, Dissert. Pharm. Pharmacol., **XXIV**, 2, 193 (1972).
3. N. HOSODA, M. YATAZAWA, Agric. Biol. Chem., **43**, 821 (1979).
4. N. HOSODA, H. ITO, M. YATAZAWA, Agric. Biol. Chem., **43**, 1745 (1979).
5. T. MURASHIGE, F. SKOOG, Phisiol. Plantarum, **15**, 473 (1962).
6. S. C. JAIN, H. ROSENBERG, S. J. STOHS, Planta Medica, **31**, 109 (1977).

MECANISME BIOCHIMICE IMPLICATE ÎN ACȚIUNEA FARMACODINAMICĂ A PROPOLISULUI. II. MODIFICĂRI ÎN URMA ADMINISTRĂRII ÎN DOZĂ UNICĂ ȘI REPETATĂ

R. OLINESCU *, T. GÎDOIU **, T. SAFTA *, S. NIȚĂ *, S. A. HULEA ***

Rezumat. S-au studiat modificările biochimice la șobolani tratați cu propolis în doză unică și repetată. În urma unei singure doze de propolis, determinarea activității transaminazelor, fosfatazelor acide și ceruloplasminei serice nu pare să reflecte existența unor leziuni celulare, lizozomale, respectiv o reactivitate crescută. Aceste date, asociate cu o ușoară creștere a bilirubinemiei, sugerează o excreție biliară mărită ca principală cale de eliminare a propolisului. În urma administrării unor doze repetate de propolis s-a observat scăderea fracțiunilor α- și β-globulinice din ser, precum și a trigliceridelor serice. Administrarea repetată a produsului a condus la inducerea în ficat a unor enzime implicate în detoxifiere, cum sînt NAD(P)H-citocrom-c-reductaza, GSH-transferaza, epoxidhidrataza și triptofanoxigenaza.

Într-o lucrare anterioară (1) am arătat că propolisul purificat conține cantități mari de flavonoizi, prezentîndu-se și o tentativă de etalonare. Deși propolisul sub diferite forme galenice este larg utilizat terapeutic în multe țări, datorită complexității mari în stare nepurificată (rășini, ceruri, uleiuri etc.), cercetările biochimice sau farmacodinamice au avut o mică amploare (2), (3), (4). Astfel, nu s-a explicat de ce propolisul nu este toxic pe cale orală sau parenterală, constanta DL_{50} fiind în jur de 1500 mg/kg corp (5), (6). De asemenea, nu s-a explicat utilizarea propolisului în tratamentul bronșitelor, ulcerului, gastritelor și colitei, boli în care intervine și o metabolizare a acestui produs. În acest sens, lucrarea de față prezintă modificările biochimice produse la șobolan în urma administrării în doză unică și repetată de propolis purificat.

MATERIALE ȘI METODE

S-a utilizat propolis purificat și liofilizat, obținut de la Institutul național de cercetări pentru apicultură și apiterapie. Conform caracterizării chimice prezentate anterior (1), preparatul de propolis purificat conține aproximativ 70% flavonoizi (din care 30 de tip catechinic) și în jur de 15% fenoli.

Pentru administrarea în doză unică s-au injectat intraperitoneal la șobolani Wistar, de 180 ± 20 g, 1000 mg/kg corp propolis dizolvat în ser fiziologic, iar pentru administrare în doze repetate s-au injectat intraperitoneal 100 mg/kg corp propolis, timp de 5 zile. La intervale de timp menționate la rezultate s-au sacrificat șobolanii, recoltîndu-se serul și ficatul.

În serul și omogenatul de ficat s-au dozat următoarele enzime: ceruloplasmina (7), glutationtransferaza (E.C. 2.5.1.18) (8), NAD(P)H-citocrom-c-reductaza (E.C. 1.6.99.1) (9), epoxidhidrataza (E.C. 4.2.1.63) (10), triptofanoxigenaza (E.C. 1.13.1.12) (11), transaminazele

GOT şi GPT, lactatdehidrogenaza şi fosfataza alcalină. Ultimele trei enzime şi trigliceridele au fost determinate folosind reactivi Merck, conform tehnicii recomandate de firmă. Grupările sulfhidril s-au dozat conform metodei lui Olinescu şi Mărgineanu (12). Electroforeza proteinelor serice s-a efectuat, cu mici modificări, după tehnica lui Laemmli (13).

REZULTATE

Administrarea în doză unică

În cazul administrării în doză unică, majoritatea determinărilor s-au axat pe ser pentru a surprinde eliberarea unor enzime intracelulare (transaminaze, LDH, fosfataza acidă) ori variaţia unor componenţi ai sistemelor reactive nespecifice (ceruloplasmina, grupări SH). În tabela 1 sînt prezentate rezultatele determinărilor în ser în urma administrării în doză unică la şobolani şi recoltarea de probe după 2, 4 şi 24 de ore.

Tabela 1

Modificări biochimice în sîngele şobolanilor după administrarea în doză unică de propolis purificat (1000 mg/kg corp)

Parametrul	Timp (ore)			
	0	2	4	24
Bilirubină	0,93±0,04	0,95±0,06	1,12±0,09	0,96±0,07
GPT	10,3±1,5	12,6±1,8	15,7±1,8	12,1±1,4
GOT	14,6±1,6	17,4±1,8	18,9±1,8	16,6±1,3
LDH	120±8	126±6	138±5	130±6
SH	5,4±0,7	5,2±0,8	4,8±0,9	5,1±0,7
Ceruloplasmină	26,4±2,5	27,6±2,5	34,8±3,5	29,4±1,8
FA	12,6±1,4	10,8±1,6	13,5±2,1	11,7±1,5

Notă. Bilirubina şi ceruloplasmina sînt exprimate în mg %. Transaminazele glutamat-piruvică (GPT) şi glutamat-oxalacetică (GOT), precum şi lactatdehidrogenaza (LDH) şi fosfataza acidă (FA) sînt exprimate în mU/ml. Grupările sulfhidril (SH) sînt exprimate în 10^{-6}M/ml.

Din datele prezentate rezultă că, în urma administrării unei singure doze de propolis, la şobolani nu se observă modificări semnificative ale parametrilor studiaţi. La 4 ore după administrare se observă o uşoară creştere a bilirubinemiei totale şi a unor enzime, ca transaminazele şi ceruloplasmina. Rezultatele noastre arată o lipsă de toxicitate, manifestată atît prin absenţa unor tulburări clinice, cît şi prin valorile parametrilor studiaţi, situate în jurul datelor obţinute la animalele martor. Această interpretare sugerează fie inexistenţa unei absorbţii intestinale, fie o excreţie pe căi biliare şi poate renale. Testele calitative chimice (1) pentru flavonoizi şi fenoli, aplicate la urină şi fecale, nu au dat rezultate concludente. Studii anterioare privind absorbţia unor flavonoizi marcaţi radioactiv au arătat că ruta cea mai probabilă de eliminare a acestor compuşi este cea biliară (14), (15). Rezultatele noastre par să sprijine această ipoteză.

Administrarea repetată

În cazul administrării repetate, posibilităţile de metabolizare după o prealabilă absorbţie sînt multiple, ţinînd seama de complexitatea chimică a propolisului. Astfel, determinările în sînge ale parametrilor studiaţi

nu au arătat modificări semnificative. În schimb, aşa cum se vede din figura 1, după administrarea repetată a propolisului apar scăderi ale fracţiunilor α- şi β-globulinice din ser. Aceste scăderi, între 30 şi 50% faţă

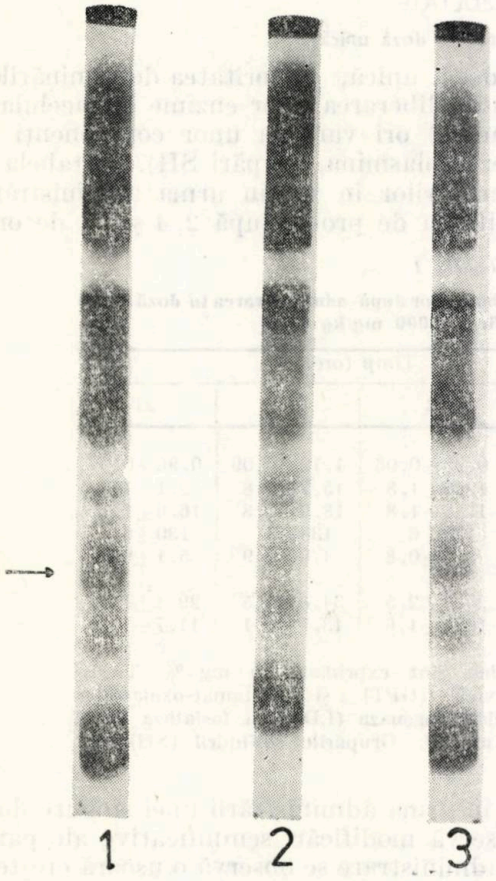


Fig. 1. — Electroforeza în gel de poliacrilamidă 7,5 % a proteinelor serice de la şobolani trataţi timp de 5 zile cu propolis :
1, ser de la şobolani netrataţi cu propolis ; *2*, ser de la şobolani trataţi 5 zile cu propolis ; *3*, ser de la şobolani netrataţi cu propolis, incubaţi cu propolis (100 µl ser + 60 µl propolis, 20 mg/ml) timp de 30 min înainte de electroforeză.

de martori, nu apar dacă, *in vitro*, la serul normal se adaugă cantităţi variabile de propolis şi apoi probele sînt supuse migrării electroforetice. Această comportare indică atît o absorbţie cît şi o metabolizare, probabil la nivel hepatic. Incubarea *in vitro* şi lipsa unui efect infirmă ipoteza unei coprecipitări a acestor fracţiuni (α şi β), deoarece flavonoizii au afinitate atît pentru globuline (16), cît şi pentru albumină (1).

Modificările electroforetice, în special ale globulinelor, ar putea fi corelate cu eventuale variaţii din metabolismul lipidelor. În figura 2 sînt prezentate modificările trigliceridelor din ser în urma administrării repetate de propolis. Tendinţa de scădere a trigliceridelor, care se observă în figura 2, constituie o altă dovadă a absorbţiei propolisului, dar este greu de interpretat. O astfel de scădere ar putea fi corelată cu transportul lipidelor prin intermediul proteinelor plasmatice ori cu eventuale variaţii ale lipidelor dintre plasmă şi ţesuturi.

Cele mai interesante modificări sînt produse la nivelul ficatului și pot fi legate de metabolizarea propolisului ori de detoxifierea și eliminarea

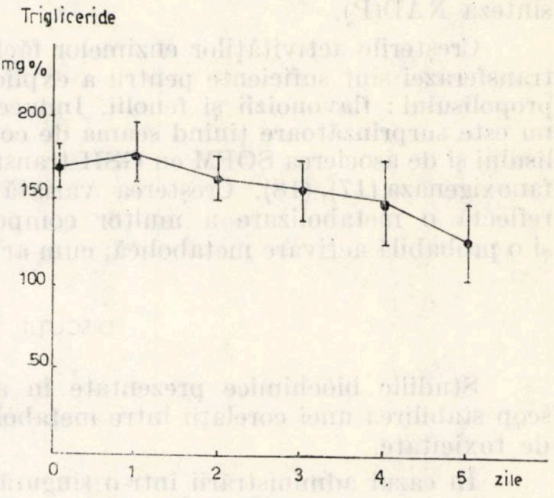


Fig. 2. — Variația trigliceridelor din ser de șobolani în cursul tratamentului cu propolis (1000 mg/kg corp).

lui pe cale biliară. Din rezultatele prezentate în tabela 2 rezultă că administrarea repetată a propolisului determină inducția principalelor sisteme enzimatice de detoxifiere compuse din sistemul oxidazic cu funcții multiple (SOFM), localizat în microzomi și din care am determinat NADH și

Tabela 2

Modificări biochimice la nivelul ficatului de șobolan după administrare repetată de propolis (1000 mg/kg corp)

Parametrul	Timp (zile)		
	0	2	5
NADH-citocrom-c-reductaza	725±18	866±21	937±28*
NADPH-citocrom-c-reductaza	88,7±3,7	96,5±4,8	128±9,8*
GSH-transferaza	4,8±0,5	5,1±0,7	9,8±1,1*
Epoxidhidrataza	22,3±1,6	20,4±1,9	32,8±2,1*
Triptofanoxigenaza	3,9±0,7	5,4±0,8	8,7±0,5*
SH total	4,4±0,9	5,8±1,2	6,8±1,4

Notă. NADH și NADPH-citocrom-c-reductazele sînt exprimate în nmoli citocrom c redus/min/mg proteină; GSH-transferaza, precum și grupările SH sînt exprimate în 10^{-6} M consumat/oră/mg proteină; epoxidhidrataza este exprimată în nmoli/min/mg proteină, iar triptofanoxigenaza în μmoli kinurenină/oră/mg proteină. Rezultatele marcate cu * sînt semnificativ diferite față de control (grupa 0) pentru $p < 0,05$.

NAD(P)H-citocrom-c-reductazele, dar și GSH-transferaza, care produce detoxifierea prin calea acizilor mercapturici. De asemenea, am observat o creștere a activității epoxidhidratazei, enzimă ce neutralizează epoxizii

produşi în cursul metabolizării multor compuşi aromatici. Din tabela 2 se mai observă creşterea activităţii triptofanoxigenazei, enzimă de asemenea inductibilă, implicată în metabolizarea triptofanului şi în biosinteza NAD(P).

Creşterile activităţilor enzimelor făcînd parte din SOFM şi a GSH-transferazei sînt suficiente pentru a explica metabolizarea componenţilor propolisului : flavonoizii şi fenolii. Inducerea multiplă a acestor sisteme nu este surprinzătoare ţinînd seama de complexitatea compoziţiei propolisului şi de asocierea SOFM cu GSH-transferaza, epoxidhidrataza şi triptofanoxigenaza (17), (18). Creşterea variată a acestor enzime inductibile reflectă o metabolizare a multor componenţi ai propolisului, precum şi o probabilă activare metabolică, cum ar fi biosinteza coenzimelor NAD.

DISCUŢII

Studiile biochimice prezentate în această lucrare au avut drept scop stabilirea unei corelaţii între metabolizarea propolisului şi lipsa lui de toxicitate.

În cazul administrării într-o singură doză a produsului, rezultatele noastre, prezentate în tabela 1, nu arată o metabolizare a propolisului. Creşterea uşoară a bilirubinemiei şi mai ales datele din literatură despre absorbţia şi eliminarea pe cale biliară a flavonoizilor (14), (15) susţin acest mecanism, valabil şi în cazul propolisului. Ţinînd seama de complexitatea compoziţiei propolisului, de existenţa ciclului enterohepatic, demonstrarea directă a acestui mecanism este foarte dificilă. Această concluzie sprijină utilizarea propolisului în tratamentul ulcerului şi al colitei şi sugerează un efect colagog, ţinînd seama şi de proprietatea tensioactivă a acestuia, semnalată în lucrarea precedentă (1).

În cazul administrării în doze repetate, datele noastre (tabela 2, fig. 1 şi 2) arată o metabolizare multiplă, chiar dacă o parte din propolis a fost eliminată pe cale biliară mai ales la începutul tratamentului, pînă la inducerea enzimelor implicate în metabolizare. Scăderea fracţiunilor α- şi β-globulinice (fig. 1) ar putea fi corelată cu descreşterea trigliceridelor (fig. 2), semnalată şi după tratament cu flavonoizi (15). Studii suplimentare sînt necesare pentru elucidarea acestui mecanism, care ar permite utilizarea medicală sporită a propolisului.

Cele mai interesante date sînt însă cele din tabela 2, care arată proprietăţile inductibile ale propolisului şi metabolizarea lui la nivelul ficatului. Metabolizarea fenolilor prin SOFM este bine cunoscută (17), iar cea a flavonoizilor este puţin cunoscută (3), dar presupune de asemenea implicarea SOFM şi GSH-transferazei. Această enzimă, care controlează calea acizilor mercapturici, formează împreună cu glucuronidazele principalul mecanism implicat în detoxifierea pe cale biliară (17), (19). Inducerea epoxidhidratazei este o consecinţă frecventă a activării SOFM, care formează epoxizi în urma metabolizării pe calea intermediară a arenoxizilor (17), (20). Epoxidhidrataza a fost implicată în etiologia cancerului (21) sau, din contră, în combaterea lui (18), (22). Acest caracter contradictoriu poate fi corelat cu lucrări ce atribuie flavonoizilor proprietăţi antitumorale (23) sau, din contră, neconcludente (24). Inducerea tripto-

fanoxigenazei (tabela 2) este de asemenea asociată cu activarea SOFM, dar și cu reactivitatea organismului în stări de stress (11). Creșterea activității triptofanoxigenazei poate fi corelată cu cea a NADH și NAD(P)H-citocrom-c-reductazelor prin stimularea biosintezei *de novo* a coenzimelor NAD(P) (17).

În concluzie, administrarea propolisului într-o gamă largă de concentrații la șobolani nu este toxică. În cazul unei doze mari, cea mai mare parte este eliminată pe cale biliară și fecală; în schimb, tratamentul cu doze mici, fracționate, determină o metabolizare multiplă prin principalele căi de detoxifiere și metabolizare a ficatului.

Prezentat la redacție
la 22 februarie 1983

* *Spitalul clinic Fundeni, București*
** *Centrul de apiterapie, București*
*** *Institutul de științe biologice, București*

BIOCHEMICAL MECHANISMS INVOLVED IN THE PHARMACODYNAMIC ACTION OF PROPOLIS. II. CHANGES FOLLOWING THE ADMINISTRATION OF SINGLE AND MULTIPLE DOSES

SUMMARY

The biochemical changes in rats treated with single and multiple doses of propolis were investigated. Following a single injection with propolis (1000 mg/kg body weight), the activity of serum transaminase, acid phosphatase and ceruloplasmin does not seem to reflect cellular, lisosomal lesions or an increased reactivity, respectively. These results together with a slight augmentation of serum bilirubin would suggest an increased biliary excretion as the main route for the excretion of propolis. Following multiple injections with propolis a decrease of serum tryglycerides level and of the α and β serum globulins was detected. A longer period of treatment with propolis allowed the detection in liver homogenates of inducible enzymes, such as NAD(P)H cytochrome c reductase, GSH transferase, epoxide hydrase and tryptophan oxygenase, which are involved in the neutralization of foreign chemicals.

BIBLIOGRAFIE

1. R. OLINESCU, T. GÎDOIU, T. SAFTA, St. cerc. biochim., **25**, 153 (1982).
2. * * * *Al 2-lea Simpozion international de apiterapie*, București, septembrie 1976.
3. * * * *Le troisième Symposium international d'Apithérapie*, Portoz, Yougoslavie, septembre, 1978.
4. * * * *The Fourth International Symposium of Apithérapy*, Accapulco, September, 1981.
5. A. ETIENNE, F. CLAUSTRE, Int. Rev. Entom. Med., 1370 (1980).
6. L. A. GRIFFITHS, Biochem. J., **92**, 173 (1964).
7. H. A. RAVIN, J. Lab. Clin. Med., **58**, 161 (1961).
8. M. ȘERBAN, S. NIȚĂ, R. OLINESCU, Rev. roum. Biochim., **16**, 147 (1979).
9. B. S. MASTERS, C. H. WILLIAMS, Methods in Enzymology, **10**, 565 (1967).

10. A. J. BAARS, M. JANSEN, D. BREIMER, Mutation Res., **62**, 279 (1979).
11. R. OLINESCU, E. PASCU, Rev. roum. Biochim., **12**, 233 (1975).
12. R. OLINESCU, I. MĂRGINEANU, Rev. roum. Biochim., **10**, 285 (1973).
13. U. K. LAEMMLI, Nature, **227**, 680 (1970).
14. L. A. GRIFFITHS, A. M. HACKETT, Biochem. J., **125**, 417 (1971).
15. L. L. FARKAŞ, M. GABOR, F. KALLAY, *Flavonoids and Bioflavonoids — Current Research Trends*, Akadémiai kiadó, Budapesta, 1977, p. 325—368.
16. N. S. CHIŞIU, D. ONICĂ, S. MIHĂESCU, St. cerc. biochim., **24**, 35 (1981).
17. V. VOICU, R. OLINESCU, *Mecanisme enzimatice în farmacodinamie*, Edit. ştiinţifică, Bucureşti, 1977, cap. 2.
18. T. WATANABE, T. SAMATO, Biochem. Biophys. Res. Commun., **87**, 469 (1979).
19. R. N. SHARMA, R. G. CAMERON, E. FARBER, Biochem. J., **182**, 317 (1979).
20. K. OTA, B. HAMMOCK, Science, **207**, 1480 (1980).
21. C. S. SINGH, C. R. WOLF, R. M. PHILPOT, Science, **207**, 1469 (1980).
22. R. KAHL, U. WULF, Toxicol. Appl. Pharmacol., **47**, 217 (1979).
23. J. MOLNAR, I. BELADI, K. BODA, Neoplasma, **26**, 11 (1981).
24. M. J. EDWARDS, J. Nat. Prod., **42**, 85 (1979).

STUDIUL COMPARATIV AL PROPRIETĂȚILOR CATALITICE ALE α-AMILAZEI LIBERE ȘI IMOBILIZATE PE ALCOOL POLIVINILIC RETICULAT

HORST D. SCHELL, TEREZIA BENE

Rezumat. Prin legarea covalentă a α-amilazei de un gel perlat de alcool polivinilic reticulat și activat cu p-benzochinonă, se obține un preparat enzimatic imobilizat catalitic activ, cu un conținut proteic de 4,5 mg/ml gel și o activitate reziduală de 3,6 %.

Prin imobilizare, α-amilaza devine mai stabilă față de valori de pH situate deasupra pH-ului optim, față de temperaturi mai crescute și față de acțiunea inhibitoare a ionilor de Cu^{2+} ($K_i = 1{,}2.10^{-4}$M, față de $K'_i = 7{,}4.10^{-4}$M) și își micșorează aparent afinitatea față de substrat ($K_m = 2{,}5.10^{-3}$ g amidon/ml, față de $K'_m = 12{,}5.10^{-3}$g amidon/ml).

Datorită proprietăților ei mecanice, chimice și catalitice remarcabile, α-amilaza imobilizată a putut fi folosită cu rezultate bune în reactoare enzimatice cu sistem în flux continuu și discontinuu la hidroliza amidonului.

α-Amilaza (α-1,4-glucan-4-glucanhidrolaza, EC 3.2.1.1) este o endoamilază care scindează hidrolitic legăturile 1,4-α-glucozidice din macromolecula amilozei și amilopectinei și se găsește larg răspîndită în natură atît în regnul animal, cît și în cel vegetal. Este produsă în cantități considerabile și de o serie de microorganisme (fungi, bacterii) și eliminată în mediul de cultură sub formă de enzimă extracelulară. Prin acțiunea ei asupra amilozei rezultă în final glucoză și maltoză, iar din amilopectină glucoză, maltoză și izomaltoză, întrucît α-amilaza nu scindează și legăturile 1,6-α-glucozidice. După cum se știe, α-amilaza este o metal-enzimă și conține cel puțin un atom de Ca pe moleculă cu rol de stabilizare a macromoleculei proteice.

În lucrarea de față prezentăm obținerea unui preparat imobilizat de α-amilază prin legarea covalentă a enzimei de alcool polivinilic reticulat (APV-X) și activat cu p-benzochinonă, în scopul de a studia proprietățile nou apărute în urma imobilizării și posibilitățile folosirii ei în reactoare enzimatice la hidroliza amidonului.

α-Amilaza a fost una din primele enzime imobilizate descrise în literatura de specialitate (1), (2) și nu au lipsit preocupări ulterioare pentru obținerea de preparate imobilizate cu aplicare în cercetare și industrie, folosindu-se o gamă largă de suporturi insolubile și metode chimice în acest scop (3)—(9).

Metoda descrisă în prezenta lucrare are avantajul că folosește ca suport insolubil un preparat elaborat exclusiv din materii prime indigene după o metodă proprie brevetată (10) și o reacție chimică de imobilizare relativ simplă, cum este cea bazată pe utilizarea p-benzochinonei drept agent de activare a suportului (11).

St. cerc. biochim., 26, 2, 173—181 (1983)

MATERIAL ŞI METODE

Activarea alcoolului polivinilic reticulat (APV—X)

Se tratează 50 ml gel perlat de APV-X cu 5,4 g p-benzochinonă dizolvată într-un volum minim de tampon fosfat (20 ml), care conţine 20 % etanol, şi se agită electromagnetic timp de o oră. Apoi se spală gelul activat mai întîi cu etanol 20 %, apoi cu apă distilată, cu o soluţie de NaCl 1 M şi, în sfîrşit, cu o soluţie de tampon fosfat 0,1 M, pH 8. Produsul rezultat, de culoare brună închis, este gata pentru a fi folosit la cuplarea enzimei.

Cuplarea α-amilazei de APV—X activat

Se adaugă 800 mg α-amilază bacteriană, dizolvată în 15 ml soluţie tampon fosfat 0,1 M, pH 8, peste 25 ml gel perlat de APV-X activat şi se agită electromagnetic în primele 2—3 ore la temperatura camerei, lăsînd apoi amestecul de reacţie să stea peste noapte la frigider (3—4°C), după care se adaugă 1 g glicină pentru dezactivarea grupărilor active ale suportului nereacţionate şi se lasă pînă a doua zi. Apoi, conjugatul enzimatic rezultat se spală de repetate ori, alternativ cu apă distilată şi cu o soluţie de NaCl 0,5 M, pînă la îndepărtarea completă a enzimei nelegate covalent.

Determinarea cantităţii enzimei legate de suport

Probe cuprinse între 0,2 şi 0,5 ml gel enzimatic se mineralizează cu acid sulfuric concentrat în baloane Kjeldahl şi se dozează conţinutul de azot din proba de gel prin metoda Parnas, exprimînd cantitatea de enzimă legată în mg proteină/ml gel.

Dozarea activităţii α-amilazei libere şi imobilizate

Pentru dozarea activităţii α-amilazei libere s-a folosit metoda iodometrică (12), determinînd cantitatea de amidon hidrolizat după acţiunea enzimei timp de 5 min la 37°C. În cazul enzimei imobilizate, în locul soluţiei de enzimă liberă, s-a folosit 0,1 ml gel enzimatic depus, exprimînd în ambele cazuri activitatea enzimatică în mg amidon hidrolizat/min/mg proteină la 37°C.

Determinarea variaţiei activităţii amilolitice a enzimei libere şi imobilizate în funcţie de pH

Se determină activitatea enzimatică a enzimei libere şi imobilizate în condiţiile arătat ; folosindu-se însă în mediul de reacţie următoarele valori de pH : 3,7 ; 5,0 ; 5,6 ; 6,7 ; 7,2 7,9 ; 8,4 ; 8,9.

Stabilirea temperaturii optime de reacţie a enzimei libere şi imobilizate

În vederea stabilirii temperaturii optime de reacţie s-a determinat activitatea enzimei libere şi imobilizate, în afara temperaturii obişnuite de lucru de 37°C, şi la următoarele temperaturi : 45, 55, 65, 75 şi 85°C.

Determinarea influenţei temperaturii de preincubare asupra activităţii enzimei libere şi imobilizate

Pentru determinarea termostabilităţii enzimei libere şi imobilizate se preincubează preparatele enzimatice timp de 30 min la temperaturi de 37, 45, 55, 65 şi 75°C, după care se dozează activitatea enzimatică.

Determinarea activităţii catalitice a α-amilazei libere şi imobilizate în funcţie de concentraţia substratului (determinarea K_m)

Se urmăreşte activitatea enzimatică a enzimei libere, în comparaţie cu enzima legată, la următoarele cantităţi de amidon în probă : 0,3 ; 0,6 ; 0,9 ; 1,2 şi 1,5 mg, ceea ce corespunde la concentraţii finale de 0,6 ; 1,2 ; 1,8 ; 2,4 şi 3,0 g amidon/l. Pentru calcularea constantei Michaelis (K_m) s-a folosit metoda grafică a lui Lineweaver-Burk de reprezentare a reciprocelor vitezelor de reacţie în funcţie de reciprocele concentraţiilor de substrat (13).

Variația activității amilolitice a enzimei libere și imobilizate în funcție de concentrația ionilor de Cu^{2+} (determinarea K_i)

Se urmărește variația vitezei de reacție în funcție de concentrații crescînde ale ionului de Cu^{2+} în mediul de reacție. Ca sare de cupru se folosește $(CH_3—COO)_2Cu$, realizîndu-se următoarele concentrații în probe : 1,0 ; 1,5 ; 2,5 ; 3,0 ; 4,5 ; 5,0 ; 7,5 și 10.10^{-4}M. Folosind două concentrații diferite de amidon la determinarea activităților enzimatice și reprezentînd grafic, după metoda Dixon (14), reciprocele vitezelor de reacție în funcție de concentrația de inhibitor, se obține constanta de inhibiție (K_i) respectivă pentru ionul studiat.

Utilizarea α-amilazei în reactoare enzimatice

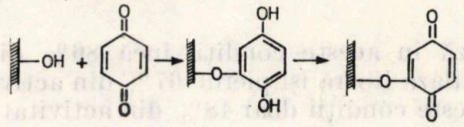
Se determină gradul de conversie a amidonului în funcție de timpul de reacție, utilizînd α-amilaza imobilizată în sistemul „batch", la temperatura camerei, procedîndu-se astfel : 10 ml conjugat enzimatic se tratează sub agitare cu 50 ml soluție de amidon 0,4%. Din amestecul de reacție se prelevează probe la 0, 15, 30 și 60 min de la începutul reacției și se determină cantitatea de amidon hidrolizat.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

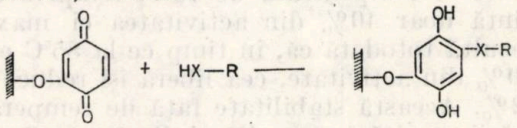
Prin legarea covalentă a α-amilazei de un gel perlat de alcool polivinilic reticulat cu epiclorhidrină și activat cu p-benzochinonă, se obține un preparat enzimatic activ insolubil cu un conținut proteic de 4,5 mg/ml gel și o activitate amilazică reziduală de 3,6%.

Reacțiile care au loc cu ocazia activării și cuplării sînt următoarele :

a) Reacția de activare



b) Reacția de cuplare



unde : R = enzima
X = NH, S, O

Activitatea reziduală relativ scăzută se încadrează totuși în valorile semnalate în literatura de specialitate, care sînt cuprinse, de regulă, între 0,8 și 5,3% (3)—(6). Rareori au fost obținute activități reziduale mai crescute și cuprinse între 6 și 16% (7)—(9). Valori relativ mici ale activităților reziduale se întîlnesc și la alte enzime imobilizate care acționează asupra substratelor macromoleculare, cum sînt proteazele, celulazele sau nucleazele, fapt care se atribuie apariției unor împiedicări sterice pe care le întîmpină enzima imobilizată în acțiunea ei asupra substratelor cu greutăți moleculare ridicate. Astfel, s-a putut constata în cazul glucoamilazei imobilizate o creștere considerabilă a activității reziduale prin

schimbarea substratului cu greutate moleculară mare (amiloză cu GM = $= 5.10^5$) cu un substrat cu o greutate moleculară mai mică (amiloză cu GM = 8.10^3) (15).

Prin imobilizare, α-amilaza își deplasează pH-ul optim de acțiune cu 0,5 unități spre domeniul alcalin, devenind totodată mai stabilă față de valori de pH mai crescute (fig. 1). Astfel, în timp ce la un pH de 7,9 α-amilaza liberă mai prezintă doar 64% din activitatea ei maximă, cea

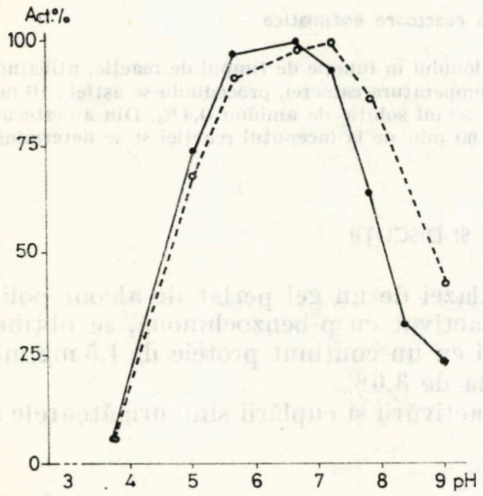


Fig. 1. — Variația activității α-amilazei libere (●——●) și imobilizate (o- - -o) în funcție de pH.

insolubilă păstrează în aceste condiții încă 86% din activitate, iar la pH 8,4, cînd α-amilaza liberă își pierde 67% din activitatea ei, cea imobilizată pierde în aceste condiții doar 48% din activitatea maximă.

Studiind influența temperaturii de reacție asupra activității catalitice a α-amilazei, se constată că prin imobilizare enzima prezintă un optim de activitate la temperatura de 75°C, temperatură la care enzima liberă mai prezintă doar 40% din activitatea ei maximă (fig. 2). Din această figură rezultă totodată că, în timp ce la 85°C enzima imobilizată mai păstrează 60% din activitate, cea liberă își reduce în aceste condiții activitatea la 22%. Această stabilitate față de temperaturi mai ridicate în urma imobilizării rezultă foarte clar și din figura 3, care prezintă activitățile amilolitice ale enzimei libere și imobilizate în urma incubării timp de 30 min la diferite temperaturi. Astfel, în timp ce enzima liberă pierde practic 50% din activitatea ei după o preincubare de 30 min la 55°C, cea imobilizată mai păstrează în aceste condiții încă 70% din activitatea maximă. Mărirea termostabilității în urma imobilizării este și mai evidentă la 75°C, cînd enzima liberă mai păstrează doar un rest de activitate de 8%, spre deosebire de cea imobilizată, care în aceste condiții mai prezintă o activitate de aproape 50% din activitatea inițială.

Determinînd activitatea enzimei libere și legate în funcție de concentrații crescînde de substrat, se obțin în cazul ambelor enzime curbe clasice Michaelis-Menten, specifice pentru enzime care acționează asupra substratelor macromoleculare.

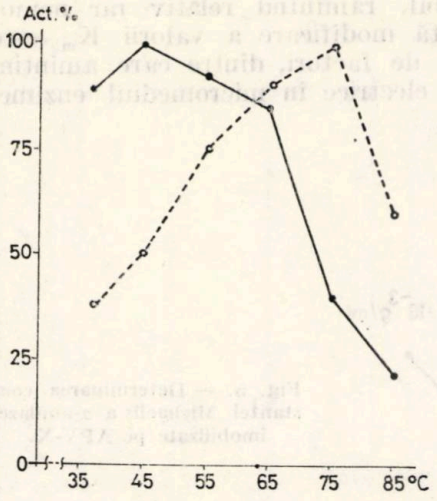


Fig. 2. — Variația activității α-amilazei libere (●——●) și imobilizate (o— — —o) în funcție de temperatura de reacție.

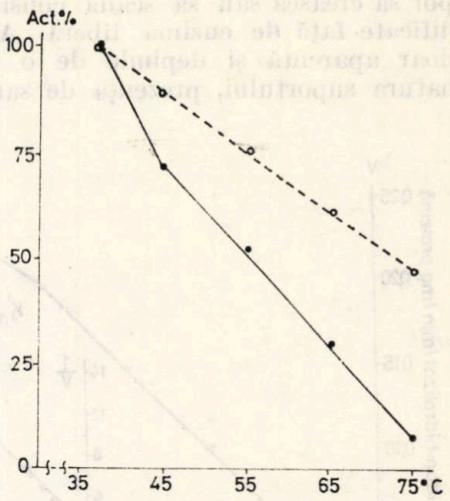


Fig. 3. — Variația activității α-amilazei libere (●——●) și imobilizate (o— — —o) în funcție de temperatura de preincubare.

Prin reprezentarea grafică a reciprocelor vitezelor de reacție în funcție de reciprocele concentrațiilor de substrat după Lineweaver-Burk (13), s-au determinat și constantele Michaelis pentru cele două forme de enzimă. Valoarea constantei Michaelis pentru α-amilaza liberă folosită de noi a fost de $2{,}5.10^{-3}$ g amidon/ml (fig. 4), valoare care se încadrează foarte bine în valorile indicate în literatură. Prin imobilizare, α-amilaza își modifică aparent afinitatea față de substrat, prezentînd o valoare pentru $K_m' = 12{,}5.10^{-3}$ g amidon/ml (fig. 5). Este bine cunoscut că enzimele, în urma imobilizării, își modifică constantele Michaelis, care

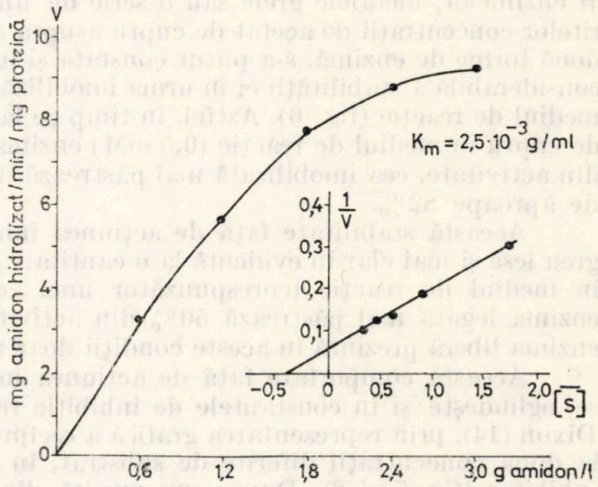


Fig. 4. — Determinarea constantei Michaelis a α-amilazei libere.

pot să crească sau să scadă considerabil, rămînînd relativ rar nemodificate faţă de enzima liberă. Această modificare a valorii K_m este doar aparentă şi depinde de o serie de factori, dintre care amintim natura suportului, prezenţa de sarcini electrice în micromediul enzimei

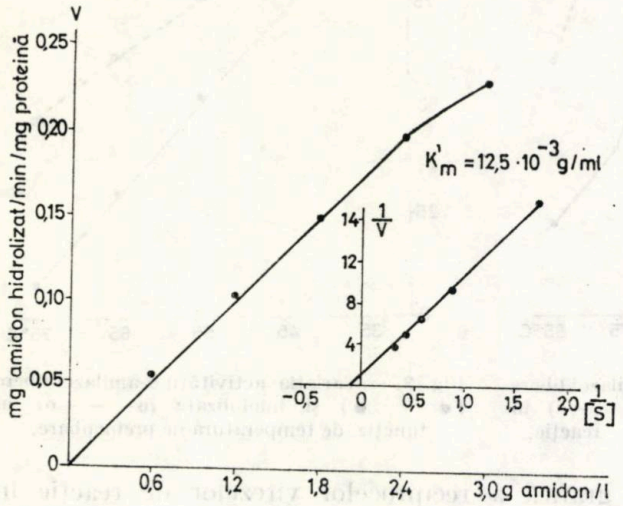


Fig. 5. — Determinarea constantei Michaelis a α-amilazei imobilizate pe APV-X.

imobilizate, natura substratului şi a produşilor de reacţie etc. În cazul α-amilazei imobilizate, mărirea valorii constantei Michaelis indică o scădere aparentă a afinităţii enzimei faţă de substratul ei, amidonul, şi se datoreşte unor împiedicări sterice între enzimă şi substrat, apărute în urma imobilizării.

Prin imobilizare, enzimele devin de regulă mai stabile faţă de acţiunea diferiţilor agenţi inhibitori, cum sînt inhibitorii naturali sau de sinteză ai enzimelor, metalele grele sau o serie de anioni. Studiind efectul diferitelor concentraţii de acetat de cupru asupra activităţii amilolitice a celor două forme de enzimă, s-a putut constata şi în cazul α-amilazei o creştere considerabilă a stabilităţii ei în urma imobilizării faţă de ionii de Cu^{2+} din mediul de reacţie (fig. 6). Astfel, în timp ce la o cantitate de 45 μg acetat de cupru în mediul de reacţie (0,5 mM) enzima liberă pierde aproape 70% din activitate, cea imobilizată mai păstrează în aceste condiţii o activitate de aproape 82%.

Această stabilitate faţă de acţiunea inhibitoare a ionilor metalului greu iese şi mai clar în evidenţă la o cantitate de 90 μg acetat de cupru în mediul de reacţie (corespunzător unei concentraţii de 1 mM), cînd enzima legată mai păstrează 50% din activitatea ei iniţială, în timp ce enzima liberă prezintă în aceste condiţii doar un rest de activitate de 3%.

Această comportare faţă de acţiunea inhibitoare a ionilor de Cu^{2+} se oglindeşte şi în constantele de inhibiţie respective, determinate, după Dixon (14), prin reprezentarea grafică a reciprocelor vitezelor de reacţie, la două concentraţii diferite de substrat, în funcţie de concentraţia de inhibitor (fig. 7 şi 8). După cum rezultă din datele experimentale obţi-

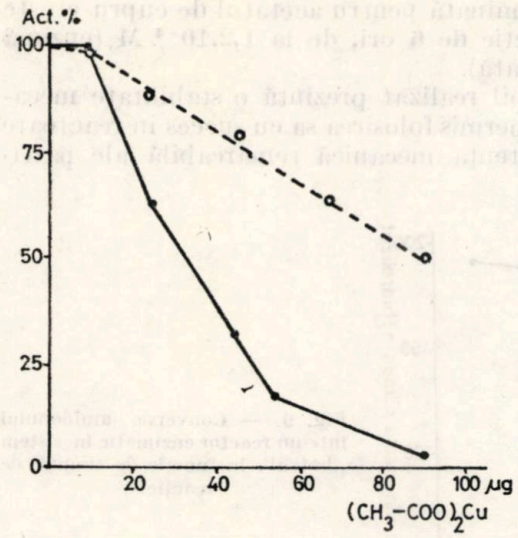


Fig. 6. — Variația activității α-amilazei libere (●——●) și imobilizate (o- - -o) în funcție de concentrații crescinde de ioni de cupru în mediul de reacție.

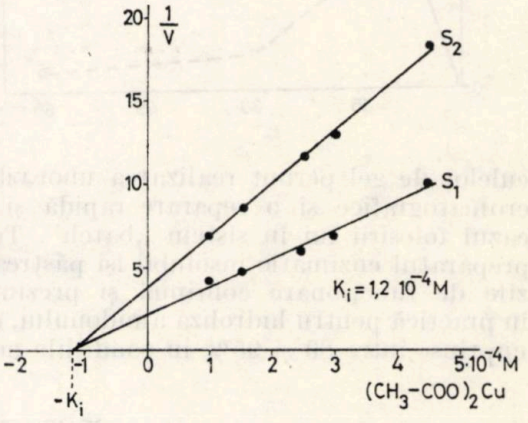


Fig. 7. — Determinarea grafică a constantei de inhibiție pentru $(CH_3-COO)_2Cu$ în cazul α-amilazei libere.

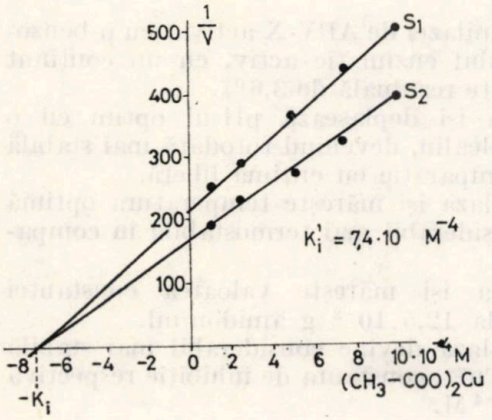


Fig. 8. — Determinarea grafică a constantei de inhibiție pentru $(CH_3-COO)_2Cu$ în cazul α-amilazei imobilizate.

nute, constanta de inhibiție determinată pentru acetatul de cupru crește în urma imobilizării enzimei practic de 6 ori, de la $1{,}2.10^{-4}$ M (enzima liberă) la $7{,}4.10^{-4}$M (enzima legată).

Preparatul enzimatic insolubil realizat prezintă o stabilitate mecanică și chimică deosebită, ceea ce a permis folosirea sa cu succes în reactoare enzimatice. Forma sferică și rezistența mecanică remarcabilă ale parti-

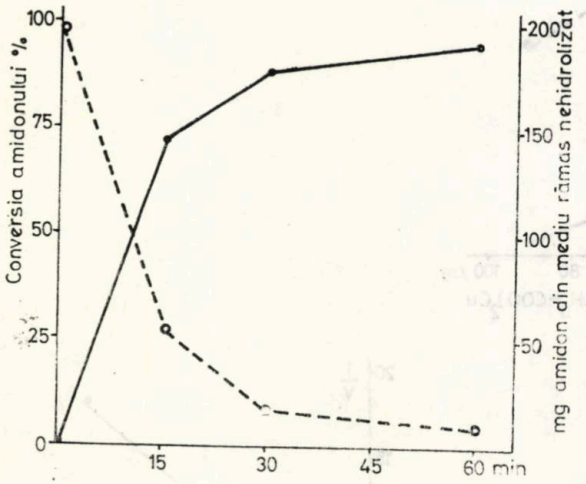


Fig. 9. — Conversia amidonului într-un reactor enzimatic în sistem „batch", în funcție de timpul de reacție.

culelor de gel permit realizarea unor viteze bune de scurgere în coloane cromatografice și o separare rapidă și completă a gelului enzimatic în cazul folosirii lui în sistem „batch". Testările preliminare au arătat că preparatul enzimatic insolubil își păstrează activitatea și după mai multe zile de funcționare continuă și prezintă reale perspective de aplicare în practică pentru hidroliza amidonului, obținîndu-se conversii ale acestuia cuprinse între 80 și 95% în condițiile noastre de lucru (fig. 9).

CONCLUZII

1. Prin legarea covalentă a α-amilazei de APV-X activat cu p-benzochinonă se obține un produs insolubil enzimatic activ, cu un conținut proteic de 4,5 mg/ml gel și o activitate reziduală de 3,6%.

2. Prin imobilizare, α-amilaza își deplasează pH-ul optim cu o jumătate de unitate spre domeniul alcalin, devenind totodată mai stabilă la valori mai crescute de pH, în comparație cu enzima liberă.

3. În urma imobilizării, α-amilaza își mărește temperatura optimă de reacție, devenind totodată și considerabil mai termostabilă în comparație cu enzima liberă.

4. Prin imobilizare, α-amilaza își mărește valoarea constantei Michaelis de 5 ori, de la $2{,}5.10^{-3}$ la $12{,}5.10^{-3}$ g amidon/ml.

5. În urma imobilizării, α-amilaza devine considerabil mai stabilă la acțiunea inhibitoare a ionului de Cu^{2+}, constanta de inhibiție respectivă crescînd de la $1.2.10^{-4}$ la $7{,}4.10^{-4}$M.

6. Preparatul enzimatic insolubil obţinut, prezentînd o stabilitate mecanică şi chimică considerabile, a putut fi folosit în reactoare enzimatice cu sistem în flux continuu (coloane enzimatice) şi discontinuu (sistem „batch") la hidroliza amidonului.

Prezentat la redacţie
la 3 iunie 1983

Institutul de ştiinţe biologice
Bucureşti, Splaiul Independenţei nr. 296

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNG DER KATALYTISCHEN EIGENSCHAFTEN DER FREIEN UND DER AN VERNETZTEN POLYVINYLALKOHOL GEBUNDENEN α-AMYLASE

ZUSAMMENFASSUNG

Durch kovalente Bindung der α-Amylase an perlförmiges Gel einemit Epichlorhydrin vernetzten und mit p-Benzoquinon aktivierten Polyvynilalkohols, wurde ein trägerfixiertes katalytisch aktives Enzympräparat mit einem Proteingehalt von 4,5 mg/ml Gel und einer Restaktivität von 3,6 % erhalten.

Als Folge der Trägerfixierung stieg die Stabilität der α-Amylase gegenüber oberhalb des pH-Optimums liegenden Werten, gegenüber höheren Temperaturen und gegenüber der hemmenden Wirkung der Cu^{2+}-Ionen ($K_i = 1{,}2.10^{-4}$ M, im Vergleich zu $K'_i = 7{,}4.10^{-4}$M), während sich die Affinität dem Substrat gegenüber verringerte ($K_m = 2{,}5.10^{-3}$g Stärke/ml, im Vergleich zu $K'_m = 12{,}5.10^{-3}$ g Stärke/ml).

Dank der vorzüglichen mechanischen, chemischen und katalytischen Eigenschaften konnte die trägerfixierte α-Amylase mit guten Ergebnissen in kontinuierlich und diskontinuierlich arbeitenden Enzymreaktoren zur Stärkehydrolyse verwendet werden.

BIBLIOGRAFIE

1. N. GRUBHOFER, L. SCHLEITH, Naturwissenschaft, **40**, 508 (1953).
2. N. GRUBHOFER, L. SCHLEITH, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **297**, 108 (1954).
3. P. BERNFELD, J. WAN, Science, **142**, 678 (1963).
4. T. FUKUSHI, T. ISEMURA, J. Biochem. (Japan), **64**, 283 (1968).
5. S. A. BARKER, P. J. SOMERS, R. EPTON, Carbohyd. Res., **8**, 491 (1968).
6. W. M. LEDINGHAM, W. E. HORNBY, Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett., **5**, 118 (1969).
7. S. A. BARKER, R. EPTON, Process. Biochem., **5**, 14 (1970).
8. G. P. CLOSSET, Y. SHAH, J. T. COBB, Biotechnol. Bioeng., **15**, 441 (1973).
9. G. P. CLOSSET, J. T. COBB, Y. SHAH, Biotechnol. Bioeng., **16**, 345 (1974).
10. H. D. SCHELL, M. A. MATEESCU, M. DIMONIE, C. OPRESCU, T. BENŢIA, Brevet românesc nr. 74486/1960.
11. J. BRANDT, L.-O. ANDERSSON, J. PORATH, Biochim. Biophys. Acta, **386**, 196 (1975).
12. J. WOHLGEMUTH, Biochem. Z., **9**, 1 (1908).
13. H. LINEWEAVER, D. BURK, J. Amer. Chem. Soc., **56**, 658 (1934).
14. M. DIXON, Biochem. J., **55**, 161 (1953).
15. H. MAEDA, H. SUZUKI, Nippon Noghikagaku Kaishi, **44**, 547 (1970), citat după *Immobilized enzymes, research and development*, de I. CHIBATA, Halsted Press, New York, 1978, p. 109.

ASUPRA CONȚINUTULUI DE FLAVONE DIN MUGURII DE PLOP

M. TĂMAȘ, I. MARINESCU

Rezumat. Printr-o metodă nouă, spectrofotometrică, în UV s-a determinat cantitativ, pentru prima dată, totalul flavonoidic din mugurii de plop negru (*Populus nigra* L.) și din rezina de muguri. Metoda se bazează pe absorbția caracteristică în UV a complexului flavonoide-Zr. Mugurii de plop uscați conțin 6,25 % flavonoide totale, exprimate în chrisină, iar rezina 59,5 %.

Mugurii de plop constituie o importantă sursă vegetală de bioflavonoide, despre care se afirmă că stau la originea propolisului, avînd în vedere identitatea dintre flavonoidele conținute în cele două produse (1), (2).

O caracteristică a flavonoidelor din mugurii de plop o constituie faptul că ele se găsesc sub formă de agliconi liberi (2), (3), și nu glicozidate, așa cum se prezintă majoritatea flavonoidelor naturale. Aceste flavonoide sînt localizate în secreţiile rezinoase dintre primele catafile, rezina reprezentînd circa 10 % din greutatea mugurilor uscați (2).

Din punct de vedere chimic, aceste flavonoide aparțin clasei flavonelor (chrisina, tectochrisina), flavonolilor (galangina, izalpinina), flavanonelor (pinocembrina și pinostrobina), chalconelor și derivaților acestora (1), (3). Multe dintre ele se caracterizează prin lipsa substituenților pe nucleul B și chiar prin lipsa OH din poziția 3 (4), (5), caractere ce influențează asupra reacțiilor de culoare cu importanță în determinarea lor cantitativă spectrofotometrică.

În literatură nu se menționează conținutul de flavonoide din muguri (3), iar metodele bazate pe reacția de culoare cu $AlCl_3$ nu pot fi aplicate pentru determinarea cantitativă a acestor flavonoide.

Într-o lucrare anterioară (2) am identificat chrisina și pinocembrina între flavonoidele din mugurii de plop negru (*Populus nigra* L.) și am evaluat cantitatea de flavonoide prin exprimare în rezină, despre care se afirmă că este constituită în proporție de 2/3 flavonoide (1). Această determinare nu este exactă deoarece nu exprimă cantitatea de flavone printr-una din componentele specifice mugurilor de plop.

În urma descrierii unei metode de determinare spectrofotometrică în UV a flavonoidelor din propolis (7), ne-am propus să aplicăm această metodă și pentru mugurii de plop, avînd în vedere asemănările flavonoidelor din cele două produse naturale.

MATERIAL ȘI METODE

Pentru înregistrarea curbelor de absorbție în UV a totalului flavonoidic din mugurii de plop, a chrisinei și a complexelor total flavonoidic-Zr și chrisină-Zr, am utilizat următoarele soluții :

— 2 ml soluție de chrisină (C. Roth) 0,01 % în alcool metilic absolut
— 2 ml soluție de chrisină 0,01 % și 1 ml soluție $ZrOCl_2 \cdot 8\,H_2O$ (E. Merck) 2,5 % în alcool metilic
— 0,25 ml soluție b
— 0,25 soluție b și 1 ml soluție 2,5 de $ZrOCl_2$

Toate soluțiile se aduc la semn cu alcool metilic absolut în baloane cotate de 25 cm^3. Înregistrarea s-a efectuat la un aparat UV-VIS (C. Zeiss, Jena) în cuve de 1 cm, față de alcool metilic absolut.

Pentru determinarea cantitativă am procedat în felul următor : 10 g muguri de plop uscați și mărunțiți grosier se extrag prin macerare la rece, de două ori timp de cîte o oră, cu cîte 50 ml alcool etilic absolut. Soluțiile filtrate se reunesc și se aduc la semn, într-un balon cotat de 100 cm^3, cu alcool etilic absolut (soluția a) ; 1,0 ml din soluția a se introduce într-un balon cotat de 50 cm^3 și se aduce la semn cu alcool metilic absolut (soluția b).

Pentru obținerea rezinei se evaporă la sec, sub presiune redusă, 10 ml soluție a, se păstrează 24 ore în exsicator pe $CaCl_2$ sicc, se cîntărește exact și se raportează procentual la muguri uscați.

Pentru determinarea cantitativă spectrofotometrică se introduce 1,0 ml din soluția b într-un balon cotat de 25 ml, se adaugă 1,0 ml soluție $ZrOCl_2$ 2,5 % în alcool metilic absolut și se aduce la semn cu alcool metilic absolut. După 5 min se citește extincția soluției la 286 nm la un aparat VSU 2—P (C. Zeiss) în cuva de 1 cm față de alcool metilic absolut.

Calcularea conținutului de flavonoide totale, exprimate în chrisină, se face cu ajutorul unei curbe de etalonare construită cu chrisină (fig. 1) în modul următor : dintr-o soluție de chrisină 0,01 % în alcool metilic absolut se introduc în 5 baloane cotate de 25 cm^3 cîte 0,1, 0,2, 0,5, 1,0 și 1,5 ml ; apoi se adaugă cîte 1,0 ml soluție $ZrOCl_2$ 2,5 % în alcool metilic absolut și se completează la semn cu alcool metilic absolut. Pe baza extincțiilor citite (tabela 1), după 5 min se construiește curba de etalonare (fig. 1).

Tabela 1

Valorile extincțiilor complexului chrisină-Zr, în funcție de concentrație

Chrisina (mg)	$ZrOCl_2$ sol. 2,5 % (ml)	E = 286 nm
0,01	1,0	0,045
0,02	1,0	0,107
0,05	1,0	0,230
0,10	1,0	0,455
0,15	1,0	0,700

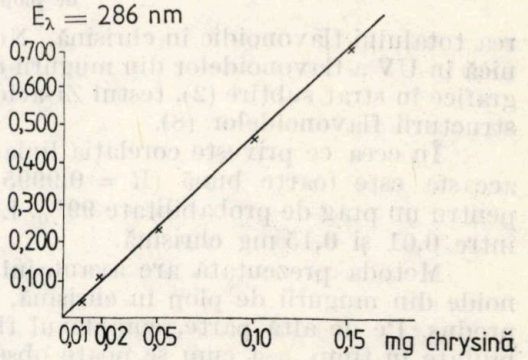


Fig. 1. — Curba de etalonare a chrisinei.

Calcularea conținutului de flavonoide totale, exprimate în chrisină, se face după formula :

$$F\,\% = \frac{E - 0{,}0063}{4{,}603} \cdot 50,$$

în care : F % — g flavonoide conținute în 100 g muguri uscați
E — extincția citită la 286 nm

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Metoda descrisă se bazează pe absorbția caracteristică în UV a complexului flavonoide-Zr, care prezintă două maxime (fig. 2), la 286 și 322 nm, primul incluzînd și complexul chrisină-Zr, ceea ce permite evalua-

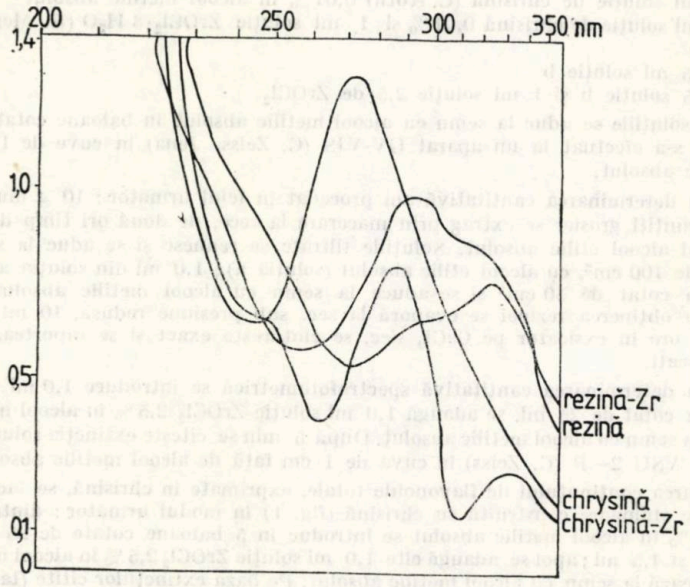


Fig. 2. — Absorbția în ultraviolete a flavonoidelor din mugurii de plop.

rea totalului flavonoidic în chrisină. Noi am observat fluorescența puternică în UV a flavonoidelor din mugurii de plop cu ocazia analizei cromatografice în strat subțire (2), testul Zr-acid citric fiind citat pentru stabilirea structurii flavonoidelor (8).

În ceea ce privește corelația liniară dintre extincție și concentrație, aceasta este foarte bună ($R = 0,9995$ și $F = 347,8$), deci semnificația pentru un prag de probabilitate 99%. Legea Lambert-Beer este respectată între 0,01 și 0,15 mg chrisină.

Metoda prezentată are avantajul că exprimă conținutul de flavonoide din mugurii de plop în chrisină, componentă caracteristică acestui produs. Pe de altă parte, complexul flavonoide-Zr prezintă o mare stabilitate în timp, așa cum se poate observa din valorile extincțiilor citite la diferite intervale de timp (tabela 2).

Tabela 2

Variația în timp a extincției complexului flavonoide-Zr din mugurii de plop

Timp (min)	0	5	15	30	60	720
E = 286 nm	0,580	0,582	0,582	0,584	0,584	0,588

Conținutul de flavonoide totale din mugurii de plop este de 6,25%, iar rezina izolată conține 59,5% flavonoide.

CONCLUZII

1. S-a aplicat o metodă nouă, spectrofotometrică, în UV pentru determinarea cantitativă a flavonoidelor din mugurii de plop. Metoda se bazează pe absorbția caracteristică în UV a complexului flavonoide-Zr și exprimă conținutul în chrisină, componentă caracteristică a mugurilor de plop.

2. Metoda prezentată este rapidă, simplă, precisă și reproductibilă.

3. Se precizează pentru prima dată conținutul de flavonoide din mugurii de plop.

Prezentat la redacție
la 30 aprilie 1983

Facultatea de farmacie, Cluj-Napoca
și
I.C.C.F. Cluj-Napoca

ON THE CONTENTS OF FLAVONOIDS IN POPLAR BUDS

SUMMARY

By a new UV spectrophotometric method, the total flavonoid contents both from the black poplar (*Populus nigra* L.) buds and their resins was determined quantitatively for the first time. The method is based on the characteristic absorption in UV of the Zr-flavonoid complex. The dried poplar buds contain 6.25% flavonoids, evaluated in chrysine, while the resin contains 59.5%.

BIBLIOGRAFIE

1. * * * *Propolisul*, Edit. Apimondia, București, 1975.
2. M. TĂMAȘ, I. MARINESCU, FLORENTINA IONESCU, St. cerc. biochim., **22**, 207 (1979).
3. R. HEGNAUER, *Chemotaxonomie der Pflanzen*, Bd. VI, Birkhäuser Verlag, Basel—Stuttgart, 1973, p. 250.
4. J. B. HARBORNE, T. J. MABRY, HELGA MABRY, *The flavonoids*, Chapman and Hall, London, 1975.
5. T. J. MABRY, K. R. MARKHAM, M. B. THOMAS, *The systematic identification of flavonoids*, Springer Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1970.
6. * * * *Farmacopeea română*, ed. a IX-a, Edit. medicală, București, 1976.
7. M. TĂMAȘ, *Procedeu pentru determinarea cantitativă a flavonoidelor din propolis și preparate cu propolis*, Brevet R.S. România nr. 79546/1982.
8. M. WICHTL, *Die Pharmakognostisch-chemische Analyse*, Akad. Verlagsgesellschaft, Frankfurt am Main, 1971, p. 155.

Multiple Forms of Enzymes (Formele multiple ale enzimelor), sub red. D. W. SCHEUCH, R. J. HASCHEN, E. HOFMANN, VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 1982, 250 p.

Odată cu impresionantele progrese făcute în domeniul purificării și caracterizării fizico-chimice a izoenzimelor, încă de la începutul anilor '60 s-a văzut că enzimele pot constitui un excelent material pentru studiul aspectelor moleculare ale stărilor patologice. Mai mult, s-a realizat importanța analizei cantitative și calitative a izoenzimelor din diferite lichide biologice în vederea stabilirii diagnosticului și urmăririi efectelor tratamentului medical.

Prezentul volum cuprinde lucrările comunicate la primul simpozion „Leonor Michaelis" de la Weimar din 1980, asupra formelor moleculare multiple ale enzimelor. Deși nu dedicat în exclusivitate aspectelor de biochimie sau enzimologie clinică, simpozionul a subliniat importanța studiului izoenzimelor pentru creșterea preciziei diagnosticului sau urmărirea, prin mijloacele analizei biochimice, a eficienței tratamentului aplicat. Cîteva lucrări cu caracter de referat general se ocupă de probleme privind importanța cuantificării formelor moleculare multiple ale enzimelor în vederea stabilirii unei corelații între specificitatea de țesut a enzimelor și specificitatea de boală. Se subliniază faptul că diferențele dintre proprietățile fizico-chimice ale izoenzimelor pot fi exploatate în scopuri analitice, și anume de stabilire a gradului de lezare biochimică și morfologică a unui organ, știut fiind că prezența în ser a unei activități enzimatice peste normal reflectă o leziune tisulară. Un exemplu tipic îl constituie fosfataza alcalină serică, ale cărei izoenzime se deosebesc destul de bine prin proprietățile lor fizico-chimice datorită provenienței lor diferite, care poate da indicații prețioase cu privire la starea fiziopatologică a organului de origine a respectivei izoenzime.

O parte importantă a lucrărilor se ocupă de studiul izoenzimelor în diferite stări patologice și valoarea determinării activității lor ca instrument de diagnostic. Alte lucrări se referă la aspecte privind biochimia izoenzimelor în general, ca, de exemplu, reglarea de către izoenzimele piruvatkinazei a metabolismului în perioada pre- și postnatală sau studiul modificărilor posttranslaționale ale enzimelor, care nu au o legătură directă cu biochimia clinică.

Prin valoarea informației prezentate credem că volumul de față se va bucura de aprecierea biochimiștilor din domeniul biochimiei medicale și a studenților facultăților cu profil biologic și medical.

Ștefan Hulea

T. TRANDABURU, *Histofiziologia comparată a pancreasului endocrin* (Comparative Histophysiology of the Endocrine Pancreas), Edit. Academiei, București, 1983, 172 p.

Cartea reprezintă o primă sinteză în literatura de specialitate consacrată fiziologiei celulare comparate a insulelor pancreatice. Structurată în 12 capitole, cartea înmănunchează cele mai recente descoperiri științifice din domeniu și se bazează în mare măsură pe contribuțiile originale ale autorului, rezultate în decursul a două decenii de activitate.

Dintre problemele importante ale histofiziologiei insulelor pancreatice, cea a tipurilor de celule endocrine este de mult timp dezbătută. Cărții îi revine meritul de a sistematiza tipurile de celule comune tuturor grupelor de vertebrate, precum și cele specifice anumitor grupe și de a sublinia detaliat afinitățile histochimice și imunohistochimice necesare identificării lor. Legat de această problemă, autorul pune la dispoziția cititorului modelele distribuției topografice a celulelor endocrine în pancreasul diferitelor grupe de vertebrate. Originea și evoluția morfofuncțională a pancreasului în cursul dezvoltării ontogenetice, precum și filogenia glandei și hormonilor săi constituie de asemenea probleme tratate pe larg în cuprinsul cărții.

Structura biochimică, proprietățile fizico-chimice și ultrastructura granulelor de secreție sînt expuse în cadrul unui capitol separat, o atenție specială fiind acordată granulelor hormonilor recent identificați (somatostatină și PP). Capitolul următor, consacrat ciclului secretor al celulelor producătoare de insulină și glucagon, conține ample referiri la procesele biosintezei, transportului intracelular, stocării și eliminării din celule a celor doi hormoni.

Contribuția originală a autorului apare deosebit de substanțială în capitolul consacrat intervenției intrinsece și controlului nervos al activității insulelor pancreatice. Capitolul conține numeroase date interesînd morfologia comparată a intervenției organului insular, mecanismele controlului nervos al secreției hormonilor specifici, influența sistemului nervos central și periferic în condiții bazale și în stările de stress, obezitate și diabet zaharat.

Problematica complexă a reglării umorale a activității pancreasului endocrin este tratată într-un capitol separat al lucrării. Acesta cuprinde cele mai semnificative observații privitoare la efectele și mecanismele acțiunii glucidelor, a aminoacizilor și a unor hormoni (STH, tiroxină, adrenalină, corticosteroizi, hormon epifizar, hormoni gastrointestinali) asupra secreției de insulină și glucagon. Capitolul se încheie cu o serie de considerații în legătură cu reglarea endocrină a metabolismului glucidic la vertebratele poikiloterme și păsări.

Ultimele trei capitole ale cărții sînt consacrate efectelor și implicațiilor fiziologice ale hormonilor pancreatici. Sînt prezentate și discutate în detaliu concepțiile actuale asupra mecanismelor de acțiune, observațiile de fiziologie comparată, efectele metabolice, hormonale și funcționale, precum și rolul fiziologic al insulinei, glucagonului, somatostatinei, gastrinei și hormonului pancreatic polipeptidic (PP).

Lucrarea beneficiază de o amplă informație bibliografică, în general recentă, de o ilustrație grafică și fotografică de bună calitate și deosebit de sugestivă, iar exprimarea, clară și concisă, facilitează înțelegerea fenomenelor. Prin conținutul lui, volumul se adresează cu precădere biologilor și medicilor care activează în domeniile morfologiei, biologiei celulare, endocrinologiei și diabetologiei. El se dovedește de asemenea util tuturor celor interesați să cunoască progresele recente realizate în cercetarea pancreasului endocrin.

Teodora Vâlsănescu

IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, Volume 28 : *The rubber industry* (Monografiile IARC asupra evaluării riscului de cancerogeneză chimică la om, vol. 28 : Industria cauciucului), Lyon, International Agency for Research on Cancer, 1982, 468 p.

Volumul include punctele de vedere ale grupului de experți IARC, întruniți la Lyon între 16 și 23 februarie 1981, și este consacrat evaluării riscului cancerogenezei în industria cauciucului : confecționarea și repararea anvelopelor, fabricarea cablurilor și a diverse obiecte de cauciuc. Grupul de lucru IARC a considerat numai etapele de amestecare a elastomerilor cu diverse substanțe chimice și de conversie ulterioară la produși finiți, deoarece multe dintre problemele adiacente au fost discutate în volumul 19 al seriei (1979).

Aspectele cuprinse în volum sînt : introducere ; istoric ; descrierea proceselor de fabricare ; chimia componentelor cauciucului și a produșilor secundari ; expunerea organismului la locul de muncă (cuprinzînd date de igienă a muncii și de control biologic) ; efecte biologice (cancerigene, mutagene, teratogene) ; studii epidemiologice.

Pentru evaluarea riscului cancerogenezei au fost luate în considerație datele epidemiologice privind extinderea și distribuția cancerului în industria cauciucului și cele privind igiena industrială, precum și date de toxicologie. În funcție de datele și dovezile considerate, evaluarea pentru fiecare substanță a fost suficientă, limitată sau inadecvată.

Anexele volumului indexează compușii chimici utilizați sau produși în industria cauciucului, menționînd aparte pe cei descriși în detaliu în monografiile IARC anterioare.

Vl. Gheordunescu

IARC Scientific Publications No. 43 : *Laboratory decontamination and destruction of carcinogens in laboratory wastes : some N-nitrosamines* (Publicațiile științifice IARC, nr. 43 : Decontaminarea laboratorului și distrugerea carcinogenilor din reziduurile de laborator : unele N-nitrozamine), Lyon, International Agency for Research on Cancer, 1982, 73 p.

Cercetările chimice și medicale, care implică într-un fel sau altul formarea și reacțiile N-nitrozaminelor (substanțe posibil cancerigene), ca și răspîndirea acestora în mediul înconjurător al omului, reclamă necesitatea distrugerii sau anihilării acestor compuși. Volumul de

față privește decontaminarea și distrugerea lor în reziduurile de laborator și face parte dintr-o serie de publicații care se ocupă, din acest punct de vedere, de numeroase substanțe cancerigene.

Sînt luate în considerație : N-nitrozo dimetilamina, -etilamina, -propilamina, -butilamina, N-nitrozo-piperidina, -pirolidina, -morfolina și N, N'-dinitrozo-piperizina. Se menționează că metodele necesare distrugerii acestor substanțe pot fi aplicate N-nitrozo-compușilor în general. În afara efectului cancerigen, dovedit la animale, compușii în speță sînt mutageni pentru o serie de bacterii și de sisteme celulare de la mamifere, *in vitro* și *in vivo*, iar unii dintre ei sînt teratogeni.

Printre tehnicile de degradare a N-nitrozaminelor sînt menționate „denitrozarea" cu acid bromhidric și acid acetic, fotoliza în prezența unor substanțe și utilizarea a diferite sisteme reducătoare, de exemplu hidroxid de sodiu și aluminiu.

Metodele pentru decontaminarea laboratorului și distrugerea acestor substanțe în reziduurile de laborator formează partea principală a lucrării. Decontaminarea se referă îndeosebi la sticlăria de laborator.

Astfel sînt recomandate tratarea cu acid bromhidric, cu permanganat de potasiu, cu săruri de trietiloxoniu, cu aliaj de nichel—aluminiu, în soluție de hidroxid de potasiu. De fiecare dată este luat în considerație modul în care se prezintă reziduul de laborator respectiv : N-nitrozamine ca atare ; soluții în etanol sau alți solvenți organici ; soluții apoase ; conținutul plăcilor Petri etc. Se urmărește în fiecare caz eficiența procedeului prin gaz-cromatografie.

Anexele volumului cuprind o trecere în revistă a nomenclaturii, datelor fizice și chimice, precum și posibilități de degradare biologică a N-nitrozaminelor.

Vl. Gheordunescu

IARC Scientific Publications No. 49 : *Laboratory decontamination and destruction of carcinogens in laboratory wastes : some polycyclic aromatic hydrocarbons* (Decontaminarea laboratorului și distrugerea cancerigenilor din reziduurile de laborator : unele hidrocarburi aromatice policiclice), Lyon, International Agency for Research on Cancer, 1983, 81 p.

Acest volum, al treilea din seria monografiilor IARC privind metodele de distrugere a substanțelor cancerigene din reziduurile de laborator, prezintă metodele recomandate pentru degradarea unor hidrocarburi aromatice policiclice.

Sînt luați în considerație șase compuși a căror cancerigenicitate asupra animalelor de experiență a fost dovedită și care au fost prezentați în seria monografiilor IARC : benzantracen, benzopiren, 7-brommetilbenzantracen, dibenzantracen, 7,12-dimetilbenzantracen, 3-metilcolantren.

Sînt descrise trei metode de oxidare, și anume : cu permanganat de potasiu în mediu acid ; cu acid sulfuric concentrat ; cu soluție apoasă saturată de permanganat de potasiu, prezentîndu-se particularitățile fiecărei metode în funcție de starea sub care se află compusul respectiv (substanță solidă, în soluție apoasă, uleioasă sau în solvenți organici, pe sticlăria de laborator și vasele Petri). Este indicată cea mai bună metodă de degradare pentru fiecare compus în parte. Eficiența procedeului este urmărită prin metode cromatografice.

Volumul include două anexe foarte utile, care cuprind nomenclatura, caracteristicile fizice și chimice, reacțiile chimice și tehnicile de degradare biologică a produșilor menționați.

Ligia Matei

JOACHIM VOLE, MICHAEL KOCH, *Die Zelle. Atlas der Ultrastruktur* (Celula. Atlasul ultrastructurii), VEB Gustav Fischer-Verlag, Jena, 1982, 270 p., 196 fig., 39 tabele colorate

Cartea prezintă, într-o formă grafică deosebită, microscopul electronic și contribuția esențială a acestuia la dezvoltarea furtunoasă a biologiei în ultimele trei decenii.

Numeroase procese biochimice și biofizice au fost explicate prin analize morfologice și funcționale care au contribuit la înțelegerea structurii celulei, elementul constitutiv al tuturor organismelor vegetale și animale. Ultrastructura celulară nu a putut fi studiată decît odată cu apariția microscopului electronic și a confirmat unitatea dialectică dintre structură și funcție.

Cartea, considerată ca un atlas, centrul de greutate fiind ilustrațiile, este împărțită în trei capitole. După o introducere în construcția microscopului electronic și în tehnica de lucru, se descrie morfologia submicroscopică a diverselor elemente celulare, iar în partea a treia, „Celula ca sistem integral", se dau exemple de diferite forme de celule, ca celule glandulare, nervoase, musculare, componente ale sîngelui, lizozomi, celule sensibile la lumină, celule membranoase ș.a.

Ilustrațiile au fost executate la secția de microscopie electronică a Universității Fr. Schiller — Jena și sînt publicate pentru prima dată. Ele prezintă o vedere de ansamblu a elementelor ultrastructurale celulare și permit corelarea structurii cu funcția. Pentru înțelegerea structurilor macromoleculare sînt date scheme colorate, însoțite de texte explicative. Sub aceeași formă sînt redate o serie de procese biochimice importante, ca activarea aminoacizilor și sinteza proteică, fotosinteza, fosforilarea, transaminarea, aparatul Golgi și rolul său în sinteza glicoproteică ș.a.

Cartea are un pronunțat caracter didactic și reușește să arate că, pentru înțelegerea vieții și a proceselor vitale, este necesară înțelegerea organizării celulei. În afară de utilitatea ei pentru studenți și biologi, sînt de remarcat frumusețea imaginilor, explicațiile riguros științifice și plăcerea de a o citi și înțelege, chiar pentru nespecialiști.

Teodora Vâlsănescu

IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, Volume 27 : *Some aromatic amines, anthraquinones and nitroso compounds, and inorganic fluorides used in drinking-water and dental preparations* (Monografiile IARC asupra evaluării riscului de cancerogeneză chimică la om, vol. 27 : Unele amine aromatice, antrachinone, nitrozo-compuși și fluoruri anorganice utilizate în apa potabilă și în preparatele dentare), Lyon, International Agency for Research on Cancer, 1982, 341 p.

Volumul de față cuprinde opiniile grupului de experți IARC, întruniți la Lyon între 10 și 17 februarie 1981.

Conform practicii editorilor, sînt expuse la început obiectivul și scopul realizării acestor volume, criteriile de alegere a substanțelor chimice considerate, principiile generale pentru evaluarea riscului cancerogenezei chimice.

Monografiile propriu-zise, în care se iau în considerație proprietățile fizice, chimice, analitice ale fiecărei substanțe, producția și utilizările, precum și datele biologice de evaluare a riscului cancerogenezei, cuprind amine aromatice (anilină, o- și p-anizidină, 4, 4'-tiodianilina etc.), compuși nitrozo (N-nitrozo- și p-nitro-difenilamina) și fluoruri anorganice utilizate în apa de băut și în preparatele dentare. Printre acestea se numără fluorurile de sodiu, de calciu și de staniu, acidul hexafluorosilicic și sarea sa disodică.

Dintre aceste substanțe, grupul de lucru IARC distinge unele care prezintă dovezi suficiente ca fiind cancerigene, altele pentru care există numai date insuficiente sau inadecvate și o a treia categorie — fluorurile menționate — care nu prezintă asemenea dovezi.

Volumul cuprinde și un apendice în care se discută efectele cancerigene posibile ale coloranților pentru păr.

Vl. Gheordunescu

IARC Scientific Publications No. 44 : *Environmental carcinogens — Selected methods of analysis*, Volume 5 : *Mycotoxins* (Substanțe cancerigene din mediu — Metode de analiză, vol. 5 : Micotoxine), sub red. H. EGAN, Lyon, International Agency for Research on Cancer, 1982, 455 p.

Volumul cuprinde metodele selectate și recomandate de Agenția internațională de cercetare a cancerului (IARC) pentru analiza unor micotoxine ce prezintă risc cancerigen și care pot contamina produsele alimentare. Compușii au fost selectați pe baza cancerigenicității, mutagenicității și teratogenicității lor, fiind incluse aflatoxinele B_1, B_2, G_1, G_2 și M, ochratoxina A, sterigmatocistina, patulina, acidul penicilic, citrinina, toxina T-2, acidul micofenolic, toxinele din *Penicillium islandicum* și rubratoxina B.

Primul capitol al cărții cuprinde : date privind efectele cancerigene ale aflatoxinelor la animalele de experiență și la om ; recoltarea și prelucrarea probelor ; prepararea și testarea soluțiilor standard de micotoxine.

În capitolul al doilea sînt prezentate șapte metode de analiză pentru aflatoxinele (compuși difuranici) din diverse alimente și din țesuturi animale. Șase din aceste metode sînt metode oficiale de analiză ale AOAC (Association of Official Analytical Chemists).

Ultimul capitol dă informații asupra cancerigenicității celorlalte micotoxine și descrie metodele de analiză pentru acestea. Sînt prezentate trei metode pentru rubratoxina B, două metode pentru ochratoxina A și cîte o metodă pentru celelalte.

Metodele de analiză recomandate se bazează pe tehnica cromatografiei în strat subțire și a cromatografiei în fază lichidă.

Ligia Matei

Biosynthese niedermolekularer Naturstoffe (Biosinteza substanțelor naturale cu greutate moleculară mică), VEB Gustav Fischer-Verlag, Jena, 1982, 176 p., 150 fig.

Cartea tratează biosinteza celor mai importante grupe de substanțe naturale cu greutăți moleculare mici, limitîndu-se la expunerea proceselor, rezultatelor și cunoștințelor de însemnătate principală în acest domeniu.

Astăzi sînt cunoscute în linii mari căile de sinteză a majorității substanțelor naturale, stabilindu-se că materialul inițial de la care pornesc diferitele procese biosintetice în natură este constituit dintr-un număr relativ mic de molecule simple.

Cele 11 capitole ale cărții tratează despre : biosinteza aminoacizilor proteinogeni, a acidului nicotinic, a porfirinelor, a substanțelor naturale a căror biosinteză pornește de la acetat, de la fenilpropan, a aminoacizilor neproteinogeni, a glicozidelor cianogene, alcaloizilor etc.

Deosebit de interesant este capitolul care tratează despre biosinteza neribozomală a unor peptide. Aminoacizii activați sînt, în acest proces, uniți într-o succesiune determinată nu pe o matriță formată de ARN, ci pe o proteină enzimatică (templat-proteic). O astfel de enzimă este gramicidin-S-sintetaza. Produsul acestui tip special de biosinteză este un oligopeptid cu structura ciclică și deci lipsită de capete terminale aminice și carboxilice.

Înțelegerea proceselor descrise în acest volum presupune cunoștințe de chimie, biologie și biochimie, adresîndu-se în mod special studenților, specialiștilor respectivi, precum și celor ce studiază farmacia, medicina și agricultura.

Margareta Dumitrescu

Flavonoids and bioflavonoids (Flavonoizi și bioflavonoizi), sub red. L. FÁRKAS, M. GÁBOR, F. KÁLLAY, H. WAGNER, Akadémiai Kiadó, Budapesta, 1982, 534 p.

Volumul conține lucrările unui simpozion internațional care a avut loc la München, în septembrie 1981.

Sînt expuse un număr mare de lucrări tratînd despre izolarea, structura și sinteza flavonoizilor naturali : noi metode sintetice de preparare a flavonoizilor și derivaților cromonici de interes medical ; biosinteza, degradarea și rolul posibil al flavonoizilor la plante ; flavonoizii în taxonomia vegetală ; acțiunea, metabolismul și conversia flavonoizilor în organismul uman și animal.

Cartea este deosebit de interesantă pentru chimiști organicieni, fotochimiști și biochimiști, dar și pentru farmacologi și biologii specializați în taxonomia plantelor.

Deosebit de interesante sînt considerațiile privitoare la rolul biologic al flavonoizilor. În acest sens este revelator faptul că trecerea evolutivă a producerii de flavonoizi în locul dihidrostilbenului pe calea metabolică, schimat-polichetid, a coincis cu apariția primelor plante de uscat. Această tranziție metabolică a permis plantelor să abandoneze mediul acvatic, care le servea ca protector contra radiațiilor ultraviolete, prin aceea că, în noua conjunctură, flavonele și mai tîrziu flavonolii au servit ca absorbanți interiori ai acestor radiații și ca atare au constituit un factor indispensabil pentru supraviețuire, în condițiile de expunere directă la radiațiile ultraviolete. Mult mai tîrziu, la plantele cele mai evoluate, adaptarea la polenizarea prin inter-

mediul insectelor a dus la apariția culorilor vii ale florilor acestor plante, corelată cu reînlocuirea flavonolilor cu anticianidine ca absorbanți ai UV. În acest proces, într-adevăr, producerea antocianidinelor și în special a complexului albastru este dependentă de scăderea conținutului în flavonoli și apare la taxonii caracterizați prin înlocuirea flavonolilor cu flavone.

Pe de altă parte, formarea ligninei (cu proces paralel) a contribuit la cucerirea uscatului de către plante.

Dintre lucrările cu caracter farmacologic expuse, un interes particular îl prezintă, printre altele, cea tratînd despre inhibiția de către flavone a peroxidării spontane a lipidelor sau cea tratînd despre acțiunea antivirală a flavonelor.

Margareta Dumitrescu

V. S. KIRPICHNIKOV, *Genetic bases of fish selection* (Bazele genetice ale selecției peștilor), Springer Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1981, 410 p., 81 fig., 53 tabele

Această carte este prima încercare de integrare a cunoștințelor de genetică a peștilor și a celor privitoare la bazele genetice ale selecției lor. Trebuie să arătăm însă de la început că sînt tratate în special problemele de genetică, iar tratării problemelor de selecție îi este rezervat doar ultimul capitol al cărții.

Capitolele cărții sînt intitulate : „Bazele materiale ale eredității peștilor, structura cromozomilor" ; „Genetica peștilor din crescătorii și a celor care trăiesc în apele naturale" ; „Genetica peștilor din acvarii" ; „Moștenirea caracterelor cantitative la pești — fenovariantele" ; „Genetica biochimică a peștilor" ; „Folosirea variației biochimice în studiile embriologice populaționale și evoluționiste la pești" ; „Ginogeneza la pești" ; „Probleme și metode ale selecției peștilor" ; „Concluzii".

Deosebit de interesantă și promițătoare pare folosirea markerilor biochimici, pentru selectarea unor populații prezentînd unele însușiri biologice valoroase. Un astfel de marker îl constituie transferinele serice, al căror studiu poate da indicații valoroase privitoare la rezistența la boli (hidropizie, de exemplu).

Genetica peștilor de acvariu poate da indicații interesante de ordin biologic general, ca, de exemplu, polimorfismul genetic în populațiile naturale, problema factorilor ereditari în cancer, a mecanismelor genetice implicate în determinarea sexului și a reversiei lui ș.a. Studiul geneticii tumorilor a indicat la dezvoltarea tumorilor maligne că dezvoltarea acestora poate fi determinată prin dezechilibrul numărului de gene implicate în sinteza pigmenților, prin hibridare interspecifică sau prin selecție.

Este de prevăzut ca studiile de genetică a peștilor în viitor să permită o organizare științifică a muncii de selecție, protejarea resurselor naturale de pește și reproducerea speciilor avantajoase din punct de vedere comercial în rîuri, lacuri, mări și oceane. Ele vor permite de asemenea o înțelegere mai bună a multor probleme teoretice ale biologiei moderne.

Margareta Dumitrescu

J. NEUMANN (sub red.), *Beiträge zur biologischen psychiatrie* (Contribuții la psihiatria biologică), VEB Georg Thieme, Leipzig, 1982, 283 p., 51 fig., 42 tabele

Volumul cuprinde o serie de lucrări originale menite să elucideze bazele biologice (fiziologice și biochimice) ale proceselor psihopatogene. Deosebit de interesante sînt aspectele care tratează mecanismele de acțiune ale unor substanțe chimice antidepresive. Astfel, de pildă, inhibitorii monoaminoxidazei, împiedicînd oxidarea aminelor cerebrale, contribuie implicit la menținerea unor valori critice fiziologice ale concentrațiilor acestor substanțe, valori sub care apar fenomenele de depresiune psihică ; fenomenele reglatoare ale concentrațiilor unor ioni, ca, de exemplu, ionii de calciu, în psihiatrie sînt de asemenea pe larg tratate. Astfel se arată că, în cazul alterărilor calitative sau cantitative ale factorului reglator constituit de calmodulină, apar modificări la nivele superioare de organizare a materiei vii, care duc la fenomene psihopatologice.

Un merit deosebit al volumului este acela că corelarea tuturor datelor experimentale expuse este făcută pe baza celor mai noi cunoștințe de genetică, biochimie, electrofiziologie.

Starea internă și externă a celulelor este influențată de factori endo- și exogeni prin intermediul unor constituenți proteici ai membranei celulare, și anume prin așa-numitele proteine receptoare, care dețin proprietăți specifice de legare pentru molecule de un anumit tip. În momentul cînd se formează o astfel de legătură, starea membranei celulare se modifică în privința grosimii, distribuției sarcinilor sale electrice, ceea ce duce la răspunsuri specifice din punct de vedere neurofiziologic, electrofiziologic sau biochimic.

Analiza separată sau interdisciplinară a acestor tipuri de răspunsuri este expusă într-o serie de lucrări foarte interesante.

Demne de menționat apar și lucrările care subliniază limitele sau inconvenientele unor tratamente. În acest context amintim semnalările intoxicațiilor cu litiu sau slaba eficiență a hemodializei în tratamentul schizofreniei.

Volumul, prin bogăția informațiilor, prin stilul științific concis și clar, este util nu numai specialiștilor din domeniul psihiatriei, ci și oamenilor de știință de diferite discipline, interesați în cuceririle noi ale biologiei.

Margareta Dumitrescu

Axoplasmic transport (Transportul axoplasmic), sub red. D. G. WEISS, Springer Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1982, 477 p., 181 fig.

Apariția acestui volum, consacrat fenomenelor intraneuronale corelate cu transportul prin axoni, a fost ocazionată de simpozionul de specialitate ținut la Schloss Elmau (R. F. Germania) în 1981. Volumul, la realizarea căruia au contribuit personalități de prim rang din domeniu, reflectă situația actuală a cercetărilor, consensurile la care s-a ajuns, precum și controversele rămase încă deschise. Articolele au fost asamblate de editor în șase secțiuni, consacrate motilității intracelulare în elementele extranervoase, componentelor structurale și moleculare ale axonului, caracterizării generale a transportului axoplasmic, factorilor care intervin în mecanismele de transport și tehnicile experimentale de investigare a fenomenului. Ele abordează o serie de probleme interdisciplinare, situate la granița dintre neurochimie, biologie celulară, neurofiziologie și biofizică, necesare înțelegerii fenomenului complex reprezentat de transportul intraneural. Cartea tratează despre proprietățile și manifestările acestui fenomen în diferite sisteme neurale, relațiile cu fenomenele similare din țesuturile extranervoase, implicațiile sale fiziologice și biochimice, precum și ipotezele actuale asupra mecanismului de producere. În cadrul mai multor articole sînt parțial abordate și unele aspecte interesînd rolul transportului intraaxonal pentru fiziologia și fiziopatologia neuronului.

Interesul pentru elucidarea diverselor aspecte legate de transportul axonal a crescut considerabil în ultimii ani. Prin impactul său multiplu cu problematica de biologie celulară și de neurobiologie, acest proces, de o importanță deosebită pentru funcția celulei nervoase, polarizează în prezent atenția specialiștilor care activează în domeniile biologiei celulare, neurochimiei, neuroanatomiei și neurofiziologiei. Volumul de față se dovedește de aceea de un real folos tuturor categoriilor de specialiști menționate, ca și celor interesați să se pună la punct cu progresele recente obținute în cunoașterea fenomenului complex al transportului axoplasmic.

Tiberiu Trandaburu

Progress in Sensory Physiology, sub red. H. AUTRUM, D. OTTOSON, E. R. PERL, R. F. SCHMIDT, vol. 3, W. D. WILLIS, *Control of Nociceptive Transmission in the Spinal Cord* (Controlul transmiterii nociceptive în măduva spinării), Springer Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1982, 159 p., 51 fig.

Volumul de față constituie un studiu despre mecanismele de control centrifug ale sistemului nervos central asupra durerii. Acest proces complex de prelucrare și răspuns pe care îl realizează sistemul nervos față de variații factori nocivi din mediul extern ce vin în contact brutal cu organismul animal este studiat, pe de o parte, datorită importanței clinice a durerii iar pe de altă parte din necesitatea de a obiectiva cercetările de fiziologie nervoasă orientate în acest sens.

Cartea cuprinde șapte secțiuni și un index pe subiecte.

În prima parte sînt expuse date generale în legătură cu fiziologia căilor senzoriale centrifuge.

În a doua secțiune se face o trecere în revistă a datelor cunoscute pînă în prezent în legătură cu metodele de măsurare a durerii, a testelor biologice care exprimă răspunsul în timp și intensitate al organismului animal față de stimulul nociv. Se prezintă o amplă documentație care argumentează existența căii neurale a durerii, care își are originea în creier și controlează transmiterea nociceptivă la nivelul măduvei spinării. Procedeul folosit pentru testarea analgezei la animale este suprimarea răspunsului reflex.

Sînt extrem de interesante datele în legătură cu mecanismul producerii analgezei prin stimularea eletrică a unor anumite regiuni ale creierului la animale și om. Aceste regiuni sînt astăzi perfect delimitate. Pornind de la administrarea opiaceelor pentru prevenirea durerilor, s-au realizat recent cercetări care au arătat că aceste substanțe medicamentoase acționează asupra unor receptori specifici din țesutul nervos. Prezența acestor reeeptori este legată de existența în țesutul nervos a unor substanțe opioide endogene, peptide opioide (methionin și leucin — enkephaline și endorphine) care au funcții de neurotransmițători sau modulatori. Acești receptori specifici ai opiaceelor s-au detectat în acele zone ale sistemului nervos central implicate în producerea analgezei la șocuri electrice, zone considerate de prelucrare a stimulilor nociceptivi.

În continuare, se face o solidă argumentație științifică a mecanismelor acupuncturii, care în fapt este o metodă de obținere a analgezei prin stimulare periferică.

Se analizează de asemenea mecanismele de inducere a analgezei prin stress și hipnoză.

În capitolul 3 se discută influența produselor farmaceutice asupra căilor descendente în obținerea analgezei. În capitolul 4 se analizează controlul descendent al arcului reflex, iar în capitolul 5 se aduc argumente în favoarea controlului descendent asupra neuronilor nociceptivi din coarnele dorsale ale măduvei spinării.

În ultima secțiune a cărții se discută corelațiile dintre studiile asupra analgezei și controlul descendent al arcului reflex și al neuronilor nociceptivi. Capitolul 7 este destinat literaturii, impresionantă prin întinderea ei (43 p.).

Acest studiu se adresează celor care fac cercetări de fiziologie nervoasă pe animale, medicilor neurologi și biologului interesat în mecanismele de interacțiune a complexelor celulare din sistemul nervos.

Paula Prunescu

A. PIRSON, M. H. ZIMMERMANN (sub red.), *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series*, vol. 14 B, *Nucleic Acids and Proteins in Plants*, II, *Structure, Biochemistry and Physiology of Nucleic Acids* (Acizi nucleici și proteine în plante, II, Structura, biochimia și fiziologia acizilor nucleici), sub red. B. PARTHIER, D. BOULTER, 1982, 774 p., 173 fig.

Conținut : Cromatina nucleară. Secvențele de ADN cromozomal și organizarea lor. Replicarea ADN-ului și ciclul celulei. Endoreduplicarea ADN-ului și replicarea diferențială. ARN-polimeraza și reglarea transcripției. Secvențele de ARN. Prelucrarea ARN-ului și alte modificări post-transcripționale. Ribonucleazele și scindarea acidului ribonucleic. Metabolismul pirimidinelor și purinelor. Structura genomurilor virale din plante. Translația ARN_s din virus la plante. Biologia, structura, funcțiile și originea posibilă a viroidelor. Plasmidele Ti de *Agrobacterium tumefacies*. Organizarea și expresia genomurilor din plastide. Biosinteza proteinelor din cloroplaste. Folosirea mutanților în studiul biogenezei cloroplastelor. Interrelația dintre cloroplaste și compartimentul nucleo-citosol din *Acetabularia*. Întrebuințarea corectă și greșită a inhibitorilor în expresia genei.

Dacă primul volum ne-a introdus în cele mai de amănunt aspecte privind proteinele, volumul de față are darul să ne prezinte într-o formă mai mult decît convingătoare cele mai diverse fațete privind structura, biochimia și fiziologia coordonatorilor tuturor proceselor din organism care sînt acizii nucleici. Deși în alcătuirea capitolelor și-au adus contribuția 21 de autori, cartea se bucură de o organizare unitară, de o expunere cursivă și logică, caracterizîndu-se prin claritate și accesibilitate.

Abordarea exigentă a unei problematici extrem de vaste ca aceea a acizilor nucleici, domeniu în care perfecționarea metodelor de investigație își spune răspicat cuvîntul, aduce cititorului un noian de cunoștințe menit să răspundă unei game largi de specialiști : biochimiști, fiziologi, fitopatologi, agronomi ș.a.

Paralel cu conturarea unor aspecte cu caracter aplicativ, cititorul găseşte în carte şi un excelent material pentru cercetare în problemele fundamentale ale biologiei. Astăzi, cînd ingineriei genetice i se acordă o tot mai mare şi meritată atenţie, apariţia volumului de faţă oferă date recente în acest domeniu şi în altele înrudite. Aprofundarea unor procese deosebit de complexe, cum ar fi replicarea, transcripţia, translaţia ş.a., a fost posibilă numai prin parcurgerea, asimilarea şi prelucrarea unor date bibliografice extrem de numeroase. De un interes notabil considerăm şi informaţiile legate de bioceneza cloroplastelor, cunoscut fiind că randamentul fotosintetic este un element al productivităţii vegetale.

Textul este cursiv, clar, uşor asimilabil, cu numeroase tabele explicite; ţinuta grafică a cărţii este ireproşabilă.

Prezenţa la sfîrşitul cărţii a unor bogate indexuri de autori (80 p.), de denumiri ale plantelor (4 p.) şi de subiecte (11 p.) conduce la o valorificare şi mai bună a datelor din carte.

Prin aspectele concentrate, prin organizarea sistematică şi cuprinzătoare, prin fineţea analizelor efectuate şi interpretarea elevată a rezultatelor, sîntem convinşi că această carte se constituie într-o adevărată delectare ştiinţifică pentru cei interesaţi.

Ioana Hagima

CORNEL BODEA (sub red.), *Tratat de biochimie vegetală*, partea a II-a: *Compoziţia chimică a principalelor plante de cultură*, vol. IV: VIORICA CUCU, CORNEL BODEA, CRISTINA CIOACĂ, *Plante medicinale şi aromatice*, Edit. Academiei, Bucureşti, 1982. 405 p.

Volumul de faţă prezintă, în cadrul celor 62 de monografii ce le cuprinde, compoziţia chimică a principalelor specii de plante medicinale şi aromatice, cultivate la noi în ţară şi în alte continente, deosebit de importante pentru medicină şi industria farmaceutică. Monografiile sînt prezentate în ordine alfabetică.

Autorii, pentru fiecare specie, fac o descriere sumară a plantei, arată aria de răspîndire şi apoi compoziţia chimică, în următorul mod: se prezintă mai întîi componentele chimice ale părţilor utilizate ale plantelor şi, în continuare, date privind compoziţia chimică a celorlalte organe, precum şi variaţia acestora în decursul ontogenezei. Sînt analizate modificările survenite în compoziţia chimică sub acţiunea factorilor externi, cum sînt condiţiile pedoclimatice şi diversele intervenţii agrotehnice şi agrochimice. Ultima parte tratează problemele de ameliorare care vizează îmbunătăţirea calitativă a părţilor plantei ce se folosesc.

Bibliografia consultată este introdusă la fiecare monografie şi este de dată recentă.

Cartea de faţă este deosebit de valoroasă pentru cei interesaţi în cunoaşterea şi cercetarea plantelor medicinale şi aromatice, farmacişti, medici, biochimişti, chimişti, agronomi, din instituţii de învăţămînt, cercetare şi industrie.

Dorin Şerban

T. G. MAMEDOV, *Biohemiluminesţenţia kletok i tkanei* (Biochemiluminescenţa celulelor şi ţesuturilor), „Elm", Baku, 1982, 58 fig., 191 p.

Biochemiluminescenţa este o proprietate universală a celulelor şi ţesuturilor. Ea reprezintă radiaţia luminoasă rece a substanţelor, indusă de diferite reacţii chimice. În monografie au fost sumarizate cercetări sistematice ale fenomenului dat, făcute de către autor împreună cu colegii săi. Mecanismele fenomenului şi legătura lui cu activitatea vitală a celulei se află în centrul atenţiei. Autorul ajunge la concluzia că la baza biochemiluminescenţei stau reacţiile de oxidare directă a lipidelor nesaturate şi a complexelor lor de către oxigenul molecular. Cu toate că oxidarea diferitelor substanţe organice provoacă biochemiluminescenţă, cea mai intensă radiaţie luminoasă se manifestă la substanţele din clasa lipidelor, în special acizii graşi nesaturaţi. Au fost studiate chemiluminescenţa la oxidarea lipidelor, la oxidarea lor catalitică şi de asemenea la interacţiunea proteină—lipid. Distrugerea mecanică a membranelor celulare, pe de o parte, ca şi acţiunea radiaţiilor ionizante şi ultraviolete asupra organismelor, pe de altă parte, sînt însoţite de radiaţii luminoase reci, condiţionate parţial de implicarea lipidelor din membrane şi ale altor lipide nesaturate în reacţia de oxidare directă. Sînt descrise metode de măsurare şi fenomenologia procesului. Volumul se adresează biologilor şi medicilor care studiază bioluminescenţa.

E. P. Bulgac

TURUSOV V. S. (sub red.), *Pathology of tumours in laboratory animals* (Patologia tumorilor la animalele de laborator), Vol. III: *Tumours of the hamsters* (Tumorile hamsterului), IARC Scientific Publications No. 34, International Agency For Research on Cancer, Lyon, 1982

Volumul cuprinde 22 de capitole în care sînt descrise tumorile benigne și maligne ale principalelor organe și țesuturi. Majoritatea capitolelor din acest volum sînt structurate uniform. Fiecare capitol este alcătuit dintr-o scurtă introducere, o parte generală în care se face descrierea structurii normale a organului sau țesutului respectiv și un subcapitol mai amplu care tratează morfologia și biologia tumorilor caracteristice. Se prezintă detaliat tipurile de tumori după caracteristicile lor histologice. Sînt analizate tumorile spontane (frecvență, caracteristici) și modul în care se pot induce tumori, după caz, cu substanțe cancerigene, virusuri, castrări și tratamente hormonale.

Ultimele două capitole descriu oncogeneza și tumorile spontane la cîteva specii înrudite cu hamsterul auriu.

Fiecare capitol cuprinde o listă cu lucrările citate și numeroase fotografii de bună calitate, care prezintă structura histologică și foarte rar ultrastructura tumorilor studiate.

Singura scădere a cărții o constituie absența unui capitol general care să prezinte principalele trăsături caracteristice ale fenomenelor canceroase la hamster.

C.-C. Prunescu

J. D. BEWLEY, M. BLACK, *Physiology and Biochemistry of Seeds, in Relation to Germination*, Vol. II: *Viability, Dormancy and Environmental Control* (Fiziologia și biochimia semințelor, în legătură cu germinația, vol. II: Viabilitatea, starea de latență și controlul prin condițiile de mediu), Springer Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1982, 375 p.

Conținut: Viabilitatea și longevitatea. Starea de latență. Întreruperea stării de latență. Controlul stării de latență. Ipoteze asupra naturii stării de latență. Influența condițiilor de mediu asupra germinației.

Lucrarea se adresează fiziologilor, botaniștilor și biochimiștilor interesați în biologia seminței.

Sînt prezentate în cadrul fiecărui subiect o serie de mecanisme fiziologice, biochimice și genetice care induc declanșarea, reglarea sau întreruperea proceselor respective. Numeroase imagini, diagrame și tabele înfățișează modificări de natură morfologică, fiziologică și biochimică ce apar în cursul fazelor de viață ale semințelor. Procesele biochimice implicate sînt discutate în mod amănunțit. Capitolul referitor la întreruperea stării de latență prezintă și numeroase metode practice de întrerupere a acestei stări prin procedee fizice sau chimice, utile pentru cei ce vor să grăbească germinarea semințelor cu latență îndelungată.

Pe lîngă cele mai recente teorii ce încearcă să explice fenomenele studiate, sînt prezentate și o serie de ipoteze mai vechi, lucrarea înfățișînd astfel și procesul de perfecționare a cunoștințelor în acest domeniu.

Textul (375 p.) este concis și clar, grafica cărții este de o foarte bună calitate.

Fiecare capitol are propria sa bibliografie și, în plus, enumerarea unor lucrări de interes general în problema respectivă.

Volumul se încheie cu glosar și index de nume botanice și în limba engleză, un index de autori și de subiecte.

Florin Mihăilescu

The Influence of Antibiotics on the Host-Parasite Relationship (Influența antibioticelor asupra relației gazdă—parazit), sub red. H. U. EICKENBERG, H. HAHN, W. OPFERKUCH, Springer Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1982, 268 p., 89 fig.

Volumul cuprinde lucrările prezentate cu ocazia primului Simpozion internațional pe tema studiului acțiunii antibioticelor asupra interrelațiilor gazdă—parazit și este structurat în două secțiuni. Prima secțiune se referă la studiul efectelor antibioticelor asupra răspunsului imun al gazdei. Se evidențiază efectul lor modulator asupra imunității în funcție de bază, intensificînd sau diminuînd răspunsul humoral al organismului-gazdă.

Efectele particulare ale diferitelor antibiotice sînt explicate prin mecanismul lor molecular de acțiune, prin gradul lor de hidro- sau liposolubilitate. Se scoate în evidență faptul că, pentru distrugerea microorganismelor care sînt fagocitate, dar au tendința să persiste în celulele fagocitare, cele mai indicate sînt antibioticele liposolubile.

Astfel volumul se constituie din acest punct de vedere într-un prețios îndreptar pentru practica clinică antiinfecțioasă, orientînd medicul în sensul adoptării atitudinii terapeutice optime.

Cea de-a doua secțiune studiază efectul antibioticelor asupra producerii factorilor extracelulari și a celor celulari care condiționează virulența microorganismelor patogene. O deosebită importanță se acordă mecanismului de aderență al celulelor bacteriene pe celulele mucoaselor, subliniindu-se interacțiunea specifică de tipul „cheii și broaștei" (key and lock), mediată de molecule specifice de recunoaștere de pe suprafața celulei bacteriene.

Pornind de la ipoteza acestui mecanism specific de interacțiune, sînt discutate noi posibilități de tratament al infecțiilor, prin administrarea unor vaccinuri constituite din receptori bacterieni, care să ocupe situsurile disponibile de pe suprafața mucoasei sensibile.

Avînd în vedere rolul esențial al structurilor de suprafață ale celulei bacteriene în fenomenul de aderență de celulele mucoasei, se propune o nouă probabilitate terapeutică ce constă în administrarea unor doze mici de antibiotice, care să nu urmărească realizarea efectului letal asupra germenului infecțios, ci să modifice doar nivelul de sinteză al componentelor chimice care intră în structurile aderente de suprafață ale celulei bacteriene, diminuînd astfel efectele secundare ale antibioticului asupra organismului-gazdă. Din acest punct de vedere, extrem de valoros pentru practică, simpozionul face o cotitură la nivelul concepției în ceea ce privește eficacitatea antibioticelor, administrarea dozelor mici eliminînd riscurile efectelor colaterale.

Volumul se adresează în primul rînd specialiștilor din domeniul microbiologiei medicale, medici clinicieni, biologi și medici din laboratoarele de bacteriologie medicală, precum și unor specialiști ai unor domenii care se întrepătrund, biochimiști, microbiologi ce studiază procesele de biosinteză a antibioticelor, imunologi etc.

Grigore Mihăiescu

Human Physiology (Fiziologie umană), sub red. R. F. SCHMIDT, G. THEWS, Springer Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1983, 689 p., 569 fig.

Lucrarea reprezintă versiunea în limba engleză a originalului apărut în limba germană, aflîndu-se la a 20-a editare.

Conceput pentru a fi utilizat de studenții în medicină, volumul se constituie ca un veritabil tratat de fiziologie umană, cuprinzînd toate aspectele moderne ale domeniului, avînd în același timp un pronunțat caracter de fundamentare a aspectelor de patofiziologie.

Structurată în 29 de capitole, lucrarea, la realizarea căreia au contribuit numeroși autori germani, este împărțită în patru secțiuni principale: Sistem nervos; Organe de simț; Sînge, circulație și respirație; Metabolism, digestie, excreție și reglare endocrină.

În secțiunea referitoare la fiziologia sistemului nervos sînt prezentate, în capitole separate, funcția celulei nervoase, fiziologia țesutului muscular, transmiterea excitației la nivel celular precum și fiziologia sistemului motor și a sistemului nervos autonom. O atenție deosebită este acordată funcției integrative a sistemului nervos.

Autorii dezvoltă în partea consacrată organelor de simț problemele specifice fiziologiei senzoriale generale, sensibilității somato-viscerale, fiziologiei organelor de simț luate separat, precum și aspectele cibernetice ale funcționării sistemului nervos și organelor de simț.

Funcțiile sîngelui, alături de funcția inimii și fiziologia sistemului vascular, respirația pulmonară și respirația tisulară, fac obiectul celei de-a treia secțiuni.

În ultima parte sînt prezentate principalele aspecte ale balanței energetice reglarea temperaturii corpului, fiziologia muncii și fiziologia omului în mediul ambiant. De asemenea, este analizată problema nutriției, fiind prevăzute capitole separate pentru funcțiile tractului gastrointestinal, funcțiile rinichiului, respectiv pentru balanța apei și transportul fluidelor și al substanțelor solvite. Un loc important este acordat prezentării funcțiilor sistemului endocrin, inclusiv a raportului dintre sistemul nervos și glandele cu secreție internă. Sînt abordate, de asemenea, și unele aspecte speciale în domeniul endocrinologiei: „hormonii tisulari", sistemul APUD, prostaglandinele.

Prezentarea grafică de calitate contribuie, alături de nivelul tratării diferitelor probleme, la reușita unei lucrări notabile, care se adresează specialiștilor din domeniul medicinii umane, precum și al biologiei, biochimiei, psihologiei.

Alexandru-Gabriel Marinescu

Advances in anatomy, Embryology and Cell Biology, vol. 76, PETER KUGLER, *On Angiotensin-Degrading Aminopeptidases in the Rat Kidney* (Asupra aminopeptidazelor care degradează angiotensina în rinichiul de șobolan), Springer Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1982, 86 p., 88 fig.

În capitolul introductiv se prezintă angiotensina II ca fiind substanța efectoare principală a sistemului renină — angiotensină și se descriu natura și originea acestei enzime, organele și țesuturile care o produc, o conțin sau o degradează, precum și efectele sale biologice. Între acestea se citează vazoconstricția, eliberarea catecolaminelor și aldosteronului mineralocorticoid, scăderea ratei de filtrare glomerulară pe baza scăderii fluxului sanguin din rinichi și diferite efecte asupra excreției de sodiu și apă în echilibrul tubulo-glomerular.

Capitolele de material și metode, rezultate și discuții demonstrează că volumul de față reprezintă o cercetare coerentă și aprofundată de fiziologie experimentală a rinichiului, de biochimie cantitativă și de histochimie a acestui organ în domeniul localizării și efectelor angiotensinei în cursul degradării sale.

Lucrarea este utilă pentru specialiștii în endocrinologia, fiziologia și patologia rinichiului.

C.-C. Prunescu

Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology, vol. 75, VOLKER GROULS, BURKHARD HELPAP, *The Development of the Red Pulp in the Spleen* (Dezvoltarea pulpei roșii a splinei), Springer Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1982, 71 p., 37 fig.

Acest volum cuprinde un studiu aprofundat asupra hematopoiezei splenice la șobolan din perioada imediat după naștere pînă la vîrsta de 60 de zile. Deși există lucrări amănunțite asupra condiției hematopoiezei postnatale la șobolan, unele în legătură cu funcția celulei stem la nivelul măduvei osului, altele privind mecanismele care controlează dispariția hematopoiezei hepatice, se pare că nu s-au făcut cercetări mai simple, așa cum este cea de față, care are însă calitatea de a constitui un punct de plecare pentru aprecierea hematopoiezei extramedulare în urma unor boli hematologice (anemie, aplazie, leucemie) sau în condiții experimentale.

Metoda de studiu a folosit date de analiză și cinetică celulară, care s-au obținut prin observarea secțiunilor histologice semifine din pulpa roșie a splinei, precum și prin lucrări cantitative de autoradiografie pe secțiuni semifine. S-au analizat celulele reticulare și endoteliale fagocitare și nefagocitare din pulpa roșie a splinei, precum și celulele hematopoietice din seria eritrocitară, leucocitară și megacariocitară, celulele plasmatice, limfocitele, celulele monocitoide. S-au făcut aprecieri cantitative asupra activității proliferative a acestor tipuri celulare și a dinamicii lor în timp.

Toate descrierile sînt bogat ilustrate atît prin microfotografii clare ale tipurilor celulare, cît și prin tabele și grafice care surprind evoluția în timp și succesiunea evenimentelor hematoformatoare în perioada considerată. Cartea se încheie cu o listă bogată de referințe bibliografice și un index pe subiecte.

Această monografie este prețioasă pentru cercetătorii în domeniul hematopoiezei prin aportul de date asupra hematopoiezei extramedulare normale la rozătoare, în vederea înțelegerii acestui proces în condiții patologice.

Paula Prunescu

The Interferon System: A Review to 1982, Part I, sub red. SAMUEL BARON, FERDINANDO DIANZANI, G. JOHN STANTON, Texas Reports on Biology and Medicine, Volume 41, 1981—1982, 411 p.

Publicație a Universității din Texas — Galverstone, volumul pe care îl prezentăm este consacrat sistemului interferon, care a constituit de altfel și obiectul primului volum (*The Interferon System: A Current Review to 1978*, vol. 35, 1977). Volumul este dedicat dr. Lowell A. Glasgow (1932—1982), care a adus contribuții majore, recunoscute pe plan internațional, privind activitatea imunomodulatoare, antivirală și antitumorală a interferonilor și include un prim capitol de Considerații generale asupra sistemului interferon, urmat de șase capitole speciale vizînd: Proprietățile biologice ale sistemului interferon (I); Includerea interferonului în vitro și în vivo (II și III); Producerea proteinei interferon (IV); Purificarea și analiza proteinei interferon (V) și Mecanisme fiziologice și celulare ale acțiunii interferonului (VI).

Primul capitol schițează pe scurt istoricul interferonului și subliniază mecanismele fundamentale ale sistemului, implicațiile sale în alte domenii științifice și semnificația pentru medicină. Capitolele speciale sînt redactate în general în aceeași manieră, concisă și competentă, furnizînd fiecare la început un rezumat al studiilor anterioare, urmat de prezentarea informațiilor recente în problema respectivă.

Informațiile științifice oferite în lucrare certifică evoluția cunoștințelor teoretice și practice legate de interferoni. În concepția actuală, sistemul interferon este reprezentat de cel puțin trei proteine înrudite funcțional (IFNα, IFNβ și IFNγ), secretate de celule ale corpului stimulate de substanțe străine și reacționează cu diferite celule pentru a induce sinteze de proteine noi și efecte biologice mediate prin reacții biochimice. De la activitatea antivirală recunoscută inițial s-a ajuns în prezent la stabilirea faptului că interferonii afectează profund o serie de funcții vitale. Astfel, sistemul interferon a fost utilizat ca sistem model pentru studiul schimburilor de membrană și proceselor moleculare implicate în exprimarea genei și reglare celulară. Din punct de vedere clinic, experimentele cu interferon și inductorii săi în cursul infecțiilor virale și cancerului au atins punctul la care sînt indicate primele aplicații medicale. Este de așteptat ca proprietățile recent descoperite ale sistemului interferon (inclusiv asemănarea cu sistemele hormonale glicoproteice ale corpului) să facă mai eficientă utilizarea sa clinică în măsura în care în prezent sînt obținute cantități mari de interferon leucocitar și fibroblastic uman, utilizînd culturi de celule umane sau celule bacteriene conținînd gene umane.

Importanța teoretică și practică a problematicii abordate, numărul mare de date originale pe care le cuprinde fac din volumul prezentat un material informațional la zi, de o înaltă ținută științifică și în același timp accesibilitate, deosebit de util biologilor, biochimiștilor, medicilor.

Victoria Herlea

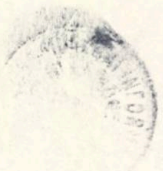
„Studii și cercetări de biochimie" publică articole originale la nivel științific superior din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici, ca : *Viața științifică*, în care prin note scurte sînt aduse la cunoștință cititorilor unele manifestări din domeniul biochimiei : congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experiență între cercetătorii români și cei străini etc., *Recenzii*, în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în țară și peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugați să înainteze articolele, notele și recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuș, pe hîrtie de calc. Tabelele și ilustrațiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planșe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea acelorași date în text, tabele și grafice. Explicația figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de inițiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanțelor internaționale.

Responsabilitatea asupra conținutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondența privind manuscrisele, schimbul de publicații etc. se va trimite pe adresa Comitetului de redacție : 78200, București 2. P.O.B. 2-2.



1983 NOV 2 5

În curs de apariție
la Editura Academiei:

A. GHERGHI și colab.
Biochimia și fiziologia legumelor și fructelor

Sinteză a cunoștințelor actuale în domeniu consemnate în literatura de specialitate, precum și a rezultatelor obținute de autori de-a lungul a trei decenii, lucrarea prezintă grupele de compuși chimici din legume și fructe după o structură unitară : natura și răspîndirea, metabolismul și dinamica acestuia. Biosinteza și biodegradarea compușilor chimici, influența pe care o exercită asupra acestor procese diferiți factori constituie elemente de bază ce servesc la perfecționarea tehnologiilor de păstrare și menținere a valorii nutritive ridicate a legumelor și fructelor pe durată cît mai mare, în vederea satisfacerii cerințelor de consum în stare proaspătă și celor ale industriei.

RM—ISSN 0049—2396

ST. CERC. BIOCHIM., TOMUL 26, NR. 2, P. 85—198, BUCUREȘTI, IULIE—DECEMBRIE 1983

c. 1499 I. P. „Informația"

43 816

Lei 30